



**HAL**  
open science

# Biodiversité, paysages et conservation de la communauté d'abeilles dans les agrosystèmes

Gabriel Carre

► **To cite this version:**

Gabriel Carre. Biodiversité, paysages et conservation de la communauté d'abeilles dans les agrosystèmes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2008. Français. NNT: . tel-02824989

**HAL Id: tel-02824989**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02824989>**

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

## ÉCOLE DOCTORALE SST

Testicule, ontogénèse et métabolisme énergétique

# THÈSE

 présentée par :

**Gwenn-Aël Carré**

soutenue le: **8 décembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

**Analyse de profils d'expression génique au cours de la  
différenciation gonadique chez le poulet.**

**Etude fonctionnelle d'un cas particulier : *BMP4* (bone  
morphogenetic protein).**

### THÈSE dirigée par :

**M. Brillard Jean-Pierre (directeur de thèse)** Directeur de recherche, INRA  
**M<sup>me</sup> Govoroun Marina (co-encadrante)** Chargée de recherche, INRA

### RAPPORTEURS :

**M<sup>me</sup> Magre Solange** Directeur de recherche, CNRS  
(Collège de France)  
**M. Baroiller Jean-François** Directeur de recherche, CIRAD

### JURY :

**M. Baroiller Jean-François** Directeur de recherche, CIRAD  
**M<sup>me</sup> Cotinot Corinne** Directeur de recherche, INRA  
**M<sup>me</sup> Duittoz Anne (Présidente de jury)** Professeur, Université de Tours  
**M<sup>me</sup> Magre Solange** Directeur de recherche, CNRS  
(Collège de France)  
**M<sup>me</sup> Govoroun Marina (co-encadrante)** Chargée de recherche, INRA  
**M. Veitia Reiner** Professeur, université de Paris VII

*A François Carré*

*Et si ton regard s'était porté sur ces pages...*

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Anne Duittoz qui a accepté d'être le président, Solange Magre et Jean-François Baroiller en tant que rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que Corinne Cotinot et Reiner Veitia en tant qu'examineurs.

Je remercie également les membres du comité de thèse (Alexis Fostier, Yann Guiguen, Eric Pailhoux, Reiner Veitia et Stéphane Fabre) pour l'intérêt et le dynamisme qu'ils ont apportés lors de ces réunions.

Je remercie messieurs Malpaux B. et Guillou F. directeurs successifs de l'unité de la physiologie et des comportements ainsi que messieurs Nys Y. et Duclos M. directeurs successifs de l'unité de recherche avicole, pour leur accueil aux seins de ces deux unités.

Je remercie Jean-Pierre Brillard pour avoir accepté d'être directeur de cette thèse et Marina Govoroun pour la grande liberté et la confiance qu'elle m'a accordées au cours de ces trois années.

Un grand merci à Isabelle Couty, Sabine Alves et Edith Guibert pour les yeux fatigués sous la loupe binoculaire, les pouces crispés sur les plaques de PCR et les cheveux arrachés sur les western-blots.

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai croisé dans les couloirs tout au long de ces années et auprès de qui j'ai glané de précieux conseils, d'utiles coups de mains ainsi que quelques fifrelins de l'indispensable produit qui me manquait.

Au tout début de cette aventure, il y avait un grand chef, une sainte Rita, un maître Yoda et une maman-poussin, merci de m'avoir donné l'envie de ce métier et d'avoir chacun à votre façon continué le chemin avec moi.

A Stéphane Fabre, je me suis jurée de faire moins dégoulinant que pour le rapport de MII mais l'idée reste la même. Merci de toutes tes discussions scientifiques, de toute ton aide et de ton soutien « non scientifique ». Reste à savoir ce que deviennent les padawans quand ils n'ont plus leur maître Yoda.

Un grand merci à Sébastien Elis, Manuela Lemoine, Elodie Pillet, Isabelle Ronecker, Larby Bedrani et Pauline Tartarin qui se sont succédé dans le bureau thésard et qui ont supporté mon mode de rangement si particulier. Nos nombreuses discussions et fous rires furent une véritable bénédiction. Bonne continuation aux « babies-juniors » même si je me sens définitivement comme une bamba triste à l'idée de vous quitter.

Je remercie également Pascale Clark, Mathieu Vidard, Nicolas Demorand et Daniel Mermet qui au quotidien m'ont rappelé que le monde ne se limitait pas à la gonade de poulet.

Je remercie mes parents pour toutes les portes que vous m'avez ouvertes et de m'avoir toujours laissé croire que l'univers des possibles était à ma portée. Merci maman pour ton soutien indéfectible à chacun de mes changements d'orientation. Et merci à Thégo et Morgane car il n'est pas toujours facile de m'avoir pour sœur.

Merci à Elsa pour tous ces petits cafés qui sont toujours de grands moments de partage et merci à Manon pour cette coloc' inattendue qui a rendu plus légère cette fin de thèse.

Merci à Gab et à tout nos sponsors (SNCF, RATP, nos opérateurs téléphoniques, Haribo, Marie B., Findus, les musées de Paris...) pour ces précieux moments de détente sans lesquels cette thèse n'aurait pas été tout à fait la même.

*« La colossale machine Science ne se repose jamais,  
elle n'est jamais satisfaite,  
elle est insatiable du mieux, que l'absolu ignore »*

*Victor Hugo, 1864*

## Résumé en Français :

Chez le poulet, le déterminisme du sexe est génétique (ZZ/ZW) mais à la différence des mammifères le déterminant majeur du sexe n'a pas été identifié. Néanmoins, un certain nombre d'acteurs moléculaires impliqués en aval dans la différenciation du testicule (*DMRT1*, *AMH*, *SOX9*...) ou de l'ovaire (*CYP19A1*, *FOXL2*, *RSPO1*...) ont été identifiés. D'autre part, le modèle poulet présente deux particularités que sont l'asymétrie du développement ovarien et la sensibilité aux stéroïdes donnant la possibilité d'inversions du sexe par des hormones exogènes. Par une analyse par PCR en temps réel à moyen débit, nous avons identifié des gènes dont l'expression est sexuellement dimorphique et/ou asymétrique au cours de la différenciation gonadique. Parmi ces gènes plusieurs membres de la famille des bone morphogenetic protein sont préférentiellement exprimés dans l'ovaire en comparaison au testicule. L'étude des effets de BMP4 sur la culture organotypique d'ovaires ou de testicules a montré qu'il était un inhibiteur de la stéroïdogénèse basale et induite par la FSH et d'autre part qu'il est un inhibiteur de l'expression de l'AMH. Résultats qui nous ont amené à émettre l'hypothèse que BMP4 était un facteur « anti-testiculaire ».

Mots clés: poulet, gonade, différenciation, gènes, BMP, stéroïdes.

## Résumé en anglais:

In chicken, sex is determined by a ZZ/ZW sex chromosome system, where the female is heterogametic (ZW). However, the mechanism involved in the sex determination is still unknown. Several genes involved in testicular (*DMRT1*, *AMH*, *SOX9*...) or in ovarian (*CYP19A1*, *FOXL2*, *RSPO1*...) differentiation have been identified. Furthermore, gonadal development in chicken embryos presents two particularities which are the asymmetrical ovarian development and the sensitivity to exogenous hormones leading to sex reversal. By real-time PCR analysis, we have identified several genes whose expression is sexually dimorphic and/or asymmetric. In particular, we showed that several members of bone morphogenetic protein family are preferentially expressed in the ovary compared to the testis. Using organotypic culture of embryonic ovaries and testes, we showed that BMP4 inhibits the basal and FSH induced steroidogenesis and is an inhibitor of *AMH* mRNA expression. These findings lead us to propose that BMP4 is an “anti-testicular” factor.

Key words: chicken, gonad, differentiation, genes, BMP, steroids.







# Table des matières :

Abréviations .....	5
Synthèse bibliographique .....	8
I- Le déterminisme du sexe chez les oiseaux .....	10
1- DMRT1 : un gène en faveur de l'effet de dosage ? .....	11
2- <i>HINTW</i> : un gène candidat comme déterminant ovarien ? .....	13
3- MHM : en faveur de l'interaction des deux hypothèses ? .....	15
4- Le modèle poulet : la fin d'un paradigme ? .....	15
II- La gonade indifférenciée .....	18
1- La morphologie .....	18
2- Les principaux gènes impliqués .....	19
a- WT1 .....	20
b- LHX9 .....	20
c- NR5A1 .....	20
III- Le développement testiculaire .....	22
1- La morphologie .....	22
2- Les principaux gènes impliqués .....	24
a- AMH .....	24
b- SOX9 .....	25
IV- Le développement ovarien .....	28
1- La morphologie .....	28
2- L'entrée en méiose des cellules germinales .....	28
3- Les principaux gènes impliqués .....	32
a- DAX1 .....	32
b- CYP19A1 .....	33
c- FOXL2 .....	33

d- NR5A1 .....	35
e- RSPO1.....	36
f- WNT4 .....	37
V- Les particularités du modèle poulet .....	38
1- L'asymétrie ovarienne .....	38
2- La sensibilité aux stéroïdes.....	42
a- La production de stéroïdes .....	42
b- La régulation par les hormones gonadotropes .....	45
c- Les inversions du sexe .....	48
• L'inversion mâle-femelle .....	52
• L'inversion femelle-mâle .....	52
Situation du travail .....	55
Partie I : étude des profils d'expression de 110 gènes au cours de la différenciation gonadique chez le poulet.....	58
Partie II : Etude de l'implication de BMP4 au cours de la différenciation gonadique chez le poulet.....	85
I- Présentation générale du système TGF $\beta$ .....	86
1- Présentation du système TGF $\beta$ .....	86
a- Les ligands .....	86
b- Les récepteurs .....	86
c- Les effecteurs cellulaires.....	88
d- Les antagonistes .....	88
2- Implication dans la gonade mâle.....	89
a- Implication dans le testicule embryonnaire .....	89
b- Implication dans le testicule post-natal.....	90
3- Implication dans la gonade femelle.....	91
a- Les facteurs ovocytaires.....	91
b- Les inhibines/activines.....	92

c- Les TGF $\beta$ .....	93
d- Les BMPs .....	93
e- L'AMH .....	94
II- BMP4 : régulateur de la stéroïdogénèse lors du développement ovarien .....	95
III- BMP4 : régulateur de la stéroïdogénèse et de l'expression de l'AMH lors du développement testiculaire .....	116
Discussion générale.....	131
I- Partie I : Etude des profils d'expression de 110 gènes au cours de la différenciation gonadique chez le poulet.....	132
II- Partie II : Etude des implications de BMP4 et de la FSH au cours de la différenciation gonadique chez le poulet.....	134
1- Régulation de la stéroïdogénèse.....	134
a- Les effets de la FSH.....	134
b- Les effets de BMP4.....	136
2- Régulation de l'expression de l'AMH .....	138
a- Le rôle de SOX9 .....	138
b- L'action des stéroïdes .....	139
3- L'implication des BMPs dans un autre modèle d'étude.....	140
Références bibliographique.....	142
Annexes.....	177

# Table des illustrations

**Figure 1** : Distribution phylogénétique du déterminisme du sexe chez les vertébrés (d'après Smith et al., 2004).

**Figure 2** : le déterminisme du sexe chez les oiseaux et les trois hypothèses envisagées

**Figure 3** : *DMRT1* est un gène en faveur de l'effet de dosage (d'après Smith *et al.*, 2009).

**Figure 4** : La région MHM limiterait l'expression de *DMRT1* chez les individus ZW permettant le développement ovarien.

**Figure 5** : la gonade indifférenciée (jour 3 à 6.5 d'incubation).

**Figure 6** : la différenciation testiculaire.

**Figure 7** : le développement ovarien.

**Figure 8** : l'entrée en méiose des cellules germinales.

**Figure 9** : La mise en place de l'asymétrie d'après (Ishimaru et al., 2008).

**Figure 10** : Les voies de synthèse des stéroïdes (d'après Bruggeman et al., 2002).

**Figure 11** : Inversion du sexe gonadique mâle-femelle suite au traitement par les œstrogènes.

**Figure 12** : Inversion du sexe gonadique femelle-mâle par un inhibiteur d'aromatase.

**Figure 13** : Expression des gènes impliqués dans la différenciation gonadique (d'après Smith et al., 2004).

**Figure 14** : Représentation de l'expression dimorphique des éléments de la superfamille du TGF $\beta$ .

**Figure 15** : Effets des différents membres de la famille du TGF $\beta$  sur l'activité transcriptionnelle de *FOXL2* dans les cellules de granulosa de brebis.

**Figure 16** : rôle de *BMP4* et *FSH* dans les gonades embryonnaires de poulet: résultats connus et perspectives.

**Tableau 1** : Tableau récapitulatif des récepteurs utilisés par les ligands du système TGF $\beta$  (d'après Itman et al., 2006).

# Abréviations

ADN: **a**cide **d**ésoxyribonucléique

AMH: **a**nti-**m**üllerian **h**ormone

AMPc: **a**dénosine **m**onophosphate cyclique

ARKO: **a**romatase **k**nock-**o**ut

ARN: **a**cide ribonucléique

BAMBI: **B**MPs and **a**ctivins **m**embrane-**b**ound inhibitor

BMP: **b**one **m**orphogenetic **p**rotein

CYP11A1: cytochrome **P**450, family **11**, subfamily **A**, polypeptide **1**; code pour la P450 cholesterol-side-chain cleavage

CYP17A1: cytochrome **P**450, family **17**, subfamily **A**, polypeptide **1**; code pour la steroid 17-alpha-hydroxylase/17, 20 lyase

CYP19A1: cytochrome **P**450, family **19**, subfamily **A**, polypeptide **1**; code pour l'aromatase

CYP26A1 : cytochrome **P**450, family **26**, subfamily **A**, polypeptide **1**; code pour l'enzyme de dégradation de l'acide rétinoïque

DAX1: **d**osage sensitive sex reversal-**a**drenal hypoplasia congenital critical region on the **X** chromosome, gene **1**

DMRT1: **d**oublesex and **M**AB-3-**r**elated transcription factor **1**

E2: oestradiol

ERKO: **e**strogen **r**eceptor **k**nock-**o**ut

ESR1: **e**strogen **r**eceptor **1**

FOXL2: **f**orkhead **b**ox **L**2

FSH: **f**ollicle **s**timulating **h**ormone

FSHR: **f**ollicle **s**timulating **h**ormone **r**eceptor

GATA4: **G**ATA binding protein **4**

GDF: **g**rowth **d**ifferentiation **f**actor

GDNF: **g**lial cell **d**erived **n**eurotrophic **f**actor

hCG: **h**uman **c**horionic **g**onadotropin

HINTW: **h**istidine **t**riad **n**ucleotide **b**inding **p**rotein

HSD3B1: **h**ydroxy-**d**elta-5-steroid **d**ehydrogenase, **3** **b**eta- and steroid delta-isomerase **1**

HSD17B1: **h**ydroxysteroid (**17-beta**) **d**ehydrogenase **1**

IGF1: **i**nsulin-like **g**rowth **f**actor **1**

LH: **l**uteinizing **h**ormone

LHR: **l**uteinizing **h**ormone **r**eceptor

LHX9: **L**IM **h**omeobox **9**

MHM: **M**ale **H**yper**M**ethylated region

oFSH: **o**vine **f**ollicle **s**timulating **h**ormone

P4: progesterone

PDGF: **p**latelet **d**erived **g**rowth **f**actor

PITX2: **p**ituitary **h**omeobox **2**

PMA: phorbol **m**yristate

PKA: **p**rotein **k**inase **A**

PKC: **p**rotein **k**inase **C**

PKT: **p**rotein **k**inase **T**

RALDH2: **r**etinaldehyde **d**ehydrogenase 1 family, member **A2**

rhBMP4: **r**ecombinant **h**uman **BMP4**

RSPO1: **R-s**pondin homolog **1**

SCP3: synaptonemal **c**omplex **p**rotein **3**

SF1: **s**teroidogenic **f**actor **1**

SMAD: **M**AD (**m**others **a**gainst **d**ecapentaplegic **D**rosophila) homolog

SOX9: **S**RY-**b**ox **9**

SRY: **S**ex-**d**etermining **R**egion of **Y** chromosome

STRA8: **s**timulated by **r**etinoic **a**cid gene **8** homolog

T4: testostérone

TGFβ: **t**ransforming **g**rowth **f**actor **b**eta

WNT4: **W**ingless-type MMTV integration site family, member **4**

WT1: **W**ilm's tumour associated gene **1**



# **Synthèse bibliographique**

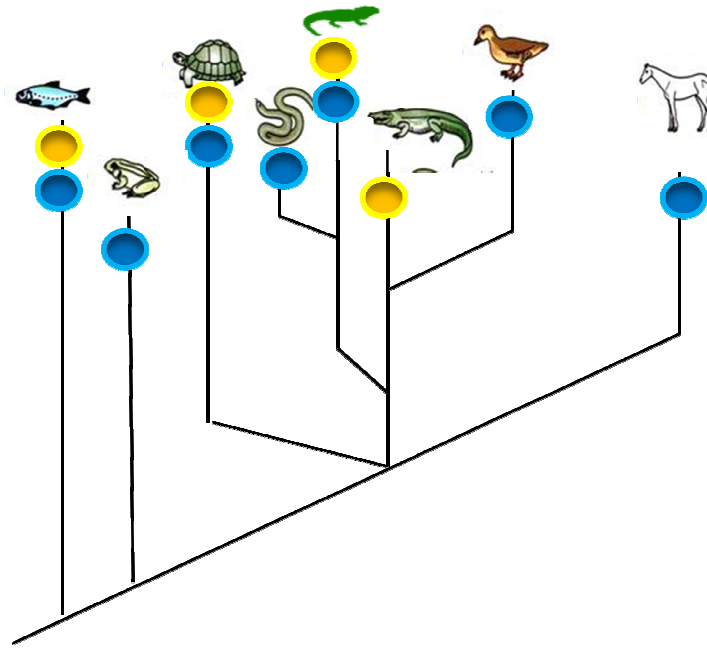




Figure 1 : Distribution phylogénétique du déterminisme du sexe chez les vertébrés (d'après Smith et al., 2004).

-  Indique un déterminisme du sexe génétique.
-  indique un déterminisme du sexe environnemental

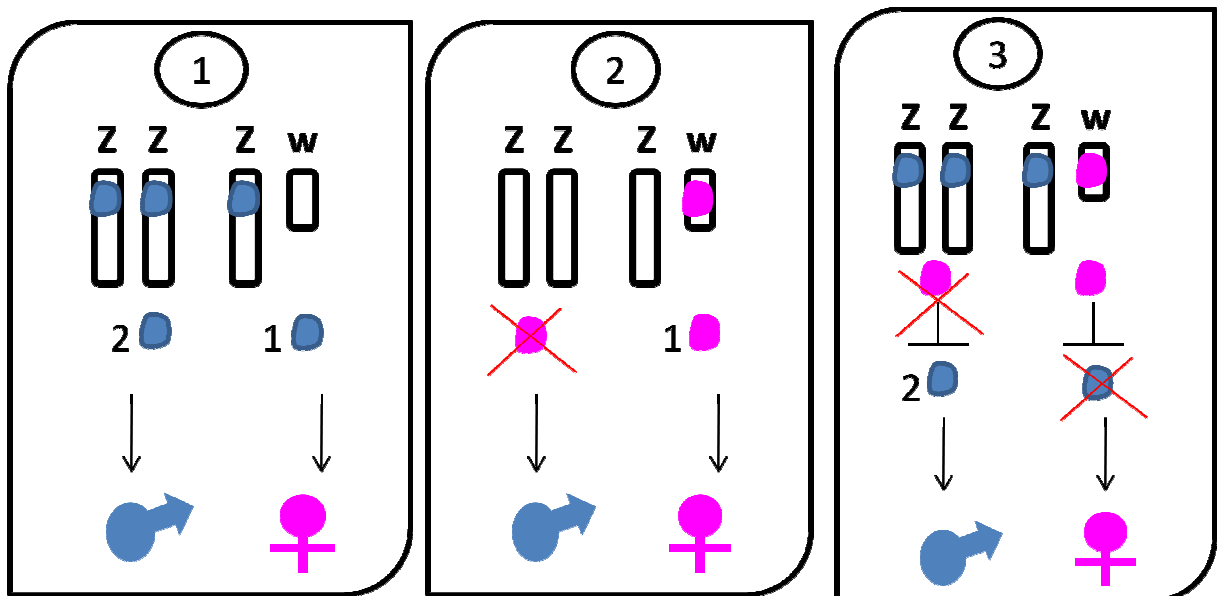


Figure 2 : le déterminisme du sexe chez les oiseaux et les trois hypothèses envisagées

Hypothèse 1 : l'effet de dosage.

Hypothèse 2 : l'existence d'un déterminant ovarien dominant.

Hypothèse 3 : un facteur porté par le chromosome W inhibe l'expression d'un facteur testiculaire porté par le chromosome Z.

## I- Le déterminisme du sexe chez les oiseaux

Le déterminisme du sexe chez les vertébrés présente différents mécanismes. Chez les oiseaux comme chez les mammifères, le déterminisme du sexe est génétique et est déterminé au moment de la fécondation par la répartition des chromosomes sexuels. Chez de nombreuses espèces de vertébrés inférieurs, le déterminisme du sexe est génétique mais le phénotype de la gonade est influencé par des facteurs environnementaux (température, PH...) ou des facteurs sociaux. De plus, chez toutes les espèces de crocodiliens et chez certaines espèces de tortues, il n'existe pas d'hétéromorphisme entre les chromosomes sexuels et seule la température d'incubation des œufs va induire le phénotype gonadique (Pieau, 1996) (Figure 1).

Le poulet présente un système de chromosomes sexuels ZZ/ZW où la femelle est hétérogamétique ZW. Cependant contrairement aux mammifères, où *SRY* (Sex-determining Region of Y chromosome) a été identifié comme étant le déterminant majeur du sexe (Sinclair *et al.*, 1990); l'existence d'un tel déterminant chez le poulet n'a pas été prouvée et trois hypothèses sont actuellement envisagées (Figure 2).

La première hypothèse suppose l'existence d'un déterminant « mâle » porté par le chromosome Z avec un effet de dosage dont la double copie de ce gène, chez les individus ZZ, induirait le développement du testicule. Cette hypothèse a été envisagée car il était admis qu'il n'existait pas de compensation de dosage chez les oiseaux (Baverstock *et al.*, 1982). Cependant de récentes études montrent que de nombreux gènes portés par le chromosome Z présentent des niveaux d'expression similaires dans les deux sexes (McQueen *et al.*, 2001). Néanmoins, cette compensation de dosage n'est pas complète puisque 300 gènes ne seraient pas « compensés » et s'exprimeraient plus dans la gonade mâle (McQueen *et al.*, 2009). Si la compensation de dosage chez les mammifères s'effectue par l'inactivation d'un des deux chromosomes X, chez les oiseaux, la transcription des gènes a lieu indifféremment sur l'un ou l'autre des chromosomes Z (Kuroda *et al.*, 2001). Dès lors la compensation de dosage pour les gènes concernés impliquerait une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle différentes entre les deux sexes (Ellegren, 2002), mécanisme observé par exemple chez la drosophile où les gènes du seul chromosome X femelle sont transcrits de façon plus importante que ceux des mâles (Marin *et al.*, 2000). La seconde hypothèse implique l'existence d'un déterminant dominant ovarien porté par le chromosome W et dont l'expression induirait le développement d'un ovaire (Ellegren, 2000).

La troisième hypothèse est basée sur l'interaction des deux premiers phénomènes; il existerait ainsi un gène porté par le chromosome W qui inhiberait un ou des gènes portés par le chromosome Z, inhibant le développement du testicule (Thorne, 1995).

Chez les mammifères, la mise en évidence que la seule présence du chromosome Y était suffisante pour induire la différenciation testiculaire a été permise par l'étude des cas de triploïdies et d'aneuploïdies (Sinclair *et al.*, 1990). En effet, les individus porteurs d'un syndrome de Klinefelter (XXY) développent des gonades mâles tandis que les porteurs d'un syndrome de Turner (XO) présentent un développement gonadique femelle.

Chez les oiseaux, aucun cas d'aneuploïdie, supposée létale, n'a été rapporté (Agate *et al.*, 2003); ne permettant pas de confirmer que la présence du chromosome W soit nécessaire et suffisante au développement ovarien. Néanmoins il existe des oiseaux triploïdes ZZW (Thorne *et al.*, 1997) qui sont intersexués au moment de l'éclosion, présentant un testicule droit et un ovotestis transitoire à gauche dont la composante ovarienne disparaît à l'âge adulte (Lin *et al.*, 1995). Ces individus seraient en faveur de l'hypothèse de l'effet de dosage; pourtant leur spermatogenèse n'est pas complète avec une méiose et des spermatozoïdes anormaux. De plus, la présence transitoire d'une composante ovarienne suggère qu'il existe un facteur porté par le chromosome W qui induit le développement ovarien mais qui est insuffisant pour empêcher l'action du ou des gènes porté(s) par les deux chromosomes Z (Lin *et al.*, 1995).

### **1- DMRT1 : un gène en faveur de l'effet de dosage ?**

*DMRT1* (Doublesex and MAB-3-Related Transcription Factor 1) est un gène porté par le chromosome Z de poulet et qui fait partie de la famille des facteurs de transcription à domaine de liaison à l'ADN (DM) (Raymond *et al.*, 1998). L'expression préférentielle de ce gène dans le testicule par rapport à l'ovaire est observé chez de nombreuses espèces de vertébrés dont les poissons, les reptiles, les oiseaux et les mammifères (Raymond *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999a; Kettlewell *et al.*, 2000; Moniot *et al.*, 2000; Shoemaker *et al.*, 2007). En effet, chez le poulet, *DMRT1* n'est exprimé que dans le système urogénital (gonades, canaux de Müller) avec une expression plus élevée dans les gonades des individus ZZ avant et pendant la différenciation gonadique (Raymond *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999a).

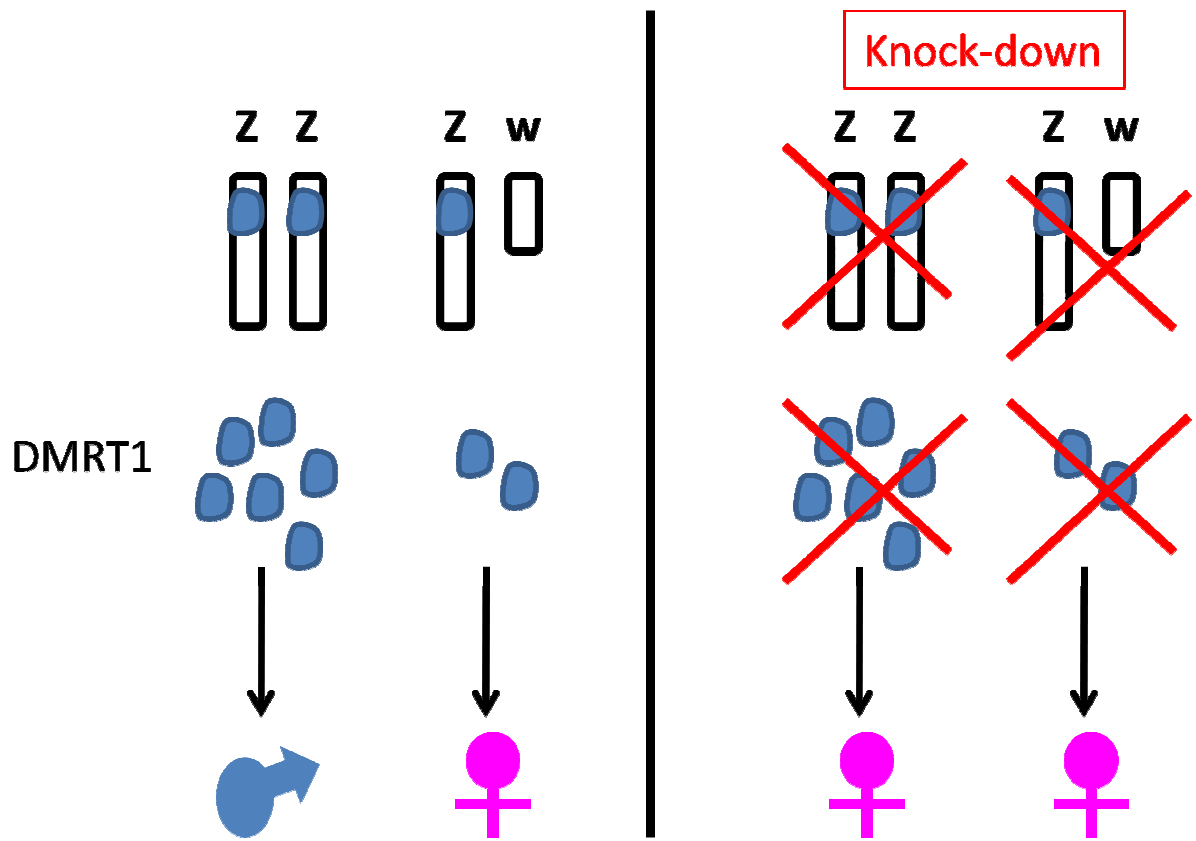


Figure 3 : *DMRT1* est un gène en faveur de l'effet de dosage (d'après Smith *et al.*, 2009).

Chez les embryons ZW (génétiquement femelle), l'inhibition par knock-down de la faible expression de DMRT1 ne perturbe pas le développement ovarien, confirmant que comme chez le rat ou chez l'Homme, ce gène n'est pas indispensable au développement ovarien (Raymond et al., 2000; Smith et al., 2009a) (Figure 3).

## **2- *HINTW* : un gène candidat comme déterminant ovarien ?**

Le chromosome W est un petit chromosome largement hétérochromatique. Seuls quelques gènes ont été identifiés sur ce chromosome et ces gènes pour la plupart comportent des homologues sur le chromosome Z. Le meilleur gène candidat est *HINTW* (Histidine triad nucleotide binding protein) aussi connu sous le nom de *ASW* ou *WPKCI* (Hori et al., 2000; O'Neill et al., 2000). Ce gène est présent en de nombreuses copies sur le chromosome W (Hori et al., 2000) et s'exprime largement dans de nombreux tissus et notamment dans les gonades (Hori et al., 2000; O'Neill et al., 2000). *HINTW* coderait pour une forme aberrante d'une nucléotide-hydrolase de type 5'monophosphoramidase dont il manque le domaine catalytique tandis qu'une forme fonctionnelle HINT est codée par un gène porté par le chromosome Z.

Des expériences *in vitro* ont montré que le produit de transcription de *HINTW* interférerait avec le fonctionnement de la forme fonctionnelle (Pace et al., 2003). Néanmoins, les expériences d'infections rétrovirales de blastoderms d'individus ZZ par le gène *HINTW*, ne modifie pas le développement testiculaire suggérant que ce gène n'est pas un déterminant ovarien dominant (Smith et al., 2009b).

De plus son influence sur l'initiation du développement ovarien est compromise par une expression précoce dans le système urogénital (jour 2) qui est très antérieure au début de la différenciation ovarienne (jour 6-6.5) (Hori et al., 2000; Yamada et al., 2004). De surcroît, il n'a pas été démontré que le transcrite du gène *HINTW* aboutissait à la synthèse d'une protéine.

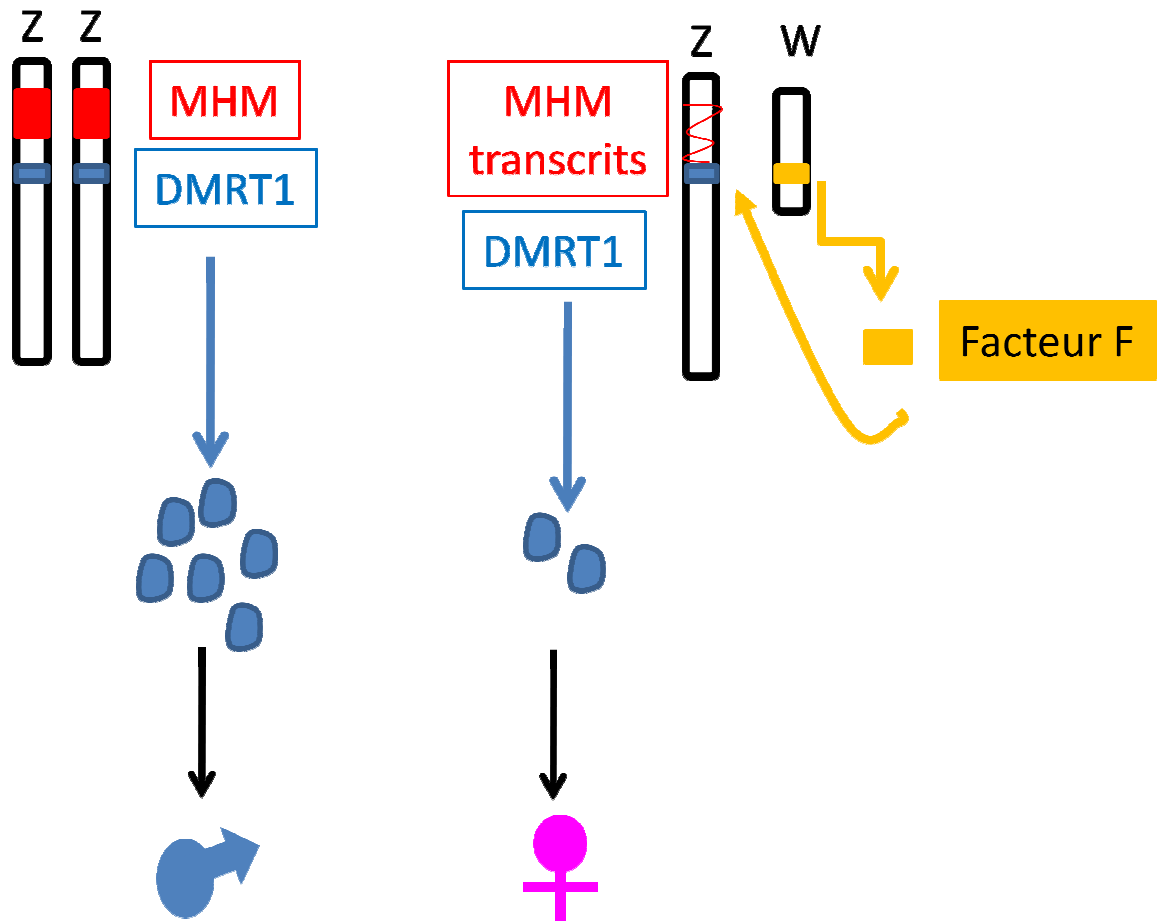


Figure 4 : La région MHM limiterait l'expression de DMRT1 chez les individus ZW permettant le développement ovarien.

### 3- MHM : en faveur de l'interaction des deux hypothèses ?

La région MHM (Male HyperMethylated) est une région de 210 répétitions en tandem d'une unité de séquence de 2.2 kb (Teranishi *et al.*, 2001). Cette région située sur le chromosome Z comporte des nucléotides CpG dont les cytosines sont hautement méthylées sur les deux chromosomes mâles et plus faiblement méthylées sur l'unique chromosome Z femelle. Une étude sur des lignées de poulet triploïdes (Thorne *et al.*, 1991; Thorne *et al.*, 1997) montre que le degré de méthylation des cytosines est aussi important chez les individus ZZZ que chez les individus ZZ tandis que le degré de méthylation est aussi faible chez les individus ZZW que chez les individus ZW; suggérant que le degré de méthylation dépend plus de la présence du chromosome W que du nombre de chromosomes Z (Teranishi *et al.*, 2001).

Cette région lorsqu'elle est déméthylée (transcriptionnellement active), code pour des ARNs non codants qui chez la femelle s'accumulent à proximité du locus *DMRT1* rendant difficile l'expression de ce gène. A l'inverse, chez les mâles ZZ, la région MHM n'est pas transcrite, laissant *DMRT1* s'exprimer et influencer sur le développement testiculaire. Cette hypothèse est confirmée par le fait que lors d'une surexpression de MHM chez les individus ZZ, il y a une diminution des niveaux d'expression de *DMRT1* (Yang *et al.*, 2009). Ces expériences supposeraient qu'il existe un facteur F porté par le chromosome W, qui déméthylerait la région MHM et permettrait ainsi de limiter l'expression de *DMRT1* et empêcherait le développement du testicule (Figure 4).

### 4- Le modèle poulet : la fin d'un paradigme ?

Selon le modèle couramment admis, le déterminisme du sexe a lieu au cours de la vie embryonnaire quand les facteurs génétiques ou environnementaux induisent la mise en place de l'ovaire ou du testicule. Ces organes vont produire les hormones qui induisent la différenciation des caractères sexuels secondaires ainsi que la mise en place du dimorphisme des caractères externes pour les espèces qui en présentent. Ainsi, l'action des chromosomes sexuels n'interviendrait qu'au niveau des gonades. Cependant, il existe des exceptions à ce paradigme comme les marsupiaux. Chez ces mammifères, la différenciation de la poche ou du scrotum apparaît avant le début de la différenciation gonadique et n'est donc pas la conséquence de l'action des hormones gonadiques.

Cette différenciation est influencée par le nombre des chromosomes X présents dans les cellules: un seul chromosome induisant la différenciation du scrotum tandis que deux



chromosomes vont induire la différenciation de la poche (O *et al.*, 1988; Renfree *et al.*, 1988). Dans la nature, de façon extrêmement rare, il existe des oiseaux gynandromorphes qui présentent un côté « mâle » (masse musculaire développée, crête développée, éperons, plumage de type mâle...) et un côté « femelle » (faible masse musculaire, petite crête, plumage de type femelle...) (Hutt, 1949; Hollander, 1975).

L'étude de trois cas de poulets gynandromorphes a montré que les cellules somatiques des différents tissus comportaient des cellules ZZ et des cellules ZW avec une prédominance du type cellulaire correspondant au phénotype. Ainsi des crêtes de type mâle comporteront plus de cellules ZZ que de cellules ZW (Zhao *et al.*, 2010). A l'inverse, le phénotype des gonades ne coïncide pas systématiquement avec le phénotype sexuel des caractères secondaires. Ainsi, les caractères présentant un dimorphisme sexuel se différencient selon la composition de leurs types cellulaires et non à la suite de l'action des hormones gonadiques puisque les tissus des deux côtés de l'individu sont imprégnés de façon similaire. Il semblerait que les cellules répondent différemment aux hormones selon les chromosomes sexuels qu'elles comportent et auraient donc une identité sexuelle intrinsèque.

D'autre part, Zhao *et al.* ont réalisé des expériences de « chimères » en transplantant, au jour 2 d'incubation, une région du mésoderme d'un donneur dans le mésoderme d'un individu receveur. Lors des transferts entre individus de même sexe, les cellules du « donneur » s'intègrent parfaitement lors du développement de la gonade; exprimant le marqueur mâle qu'est l'*AMH* chez les individus ZZ et *CYP19A1* chez les individus ZW. A l'opposé, lors de transfert du mésoderme ZW chez des individus ZZ, les cellules « donneuses » ne s'intègrent pas lors du développement des cordons testiculaires et n'expriment pas l'*AMH*. De manière similaire, lors de l'expérience réciproque, les cellules du donneur ZZ ne se sont pas intégrées aux structures exprimant *CYP19A1*. Ces résultats renforcent l'hypothèse de l'identité sexuelle propre à chaque cellule. Ces résultats s'opposent aux phénomènes observés chez les mammifères où les cellules XX deviennent des cellules de Sertoli et les cellules XY deviennent des cellules de granulosa lorsqu'elles sont transplantées dans une gonade du sexe opposé (Burgoyne *et al.*, 1988; Patek *et al.*, 1991).

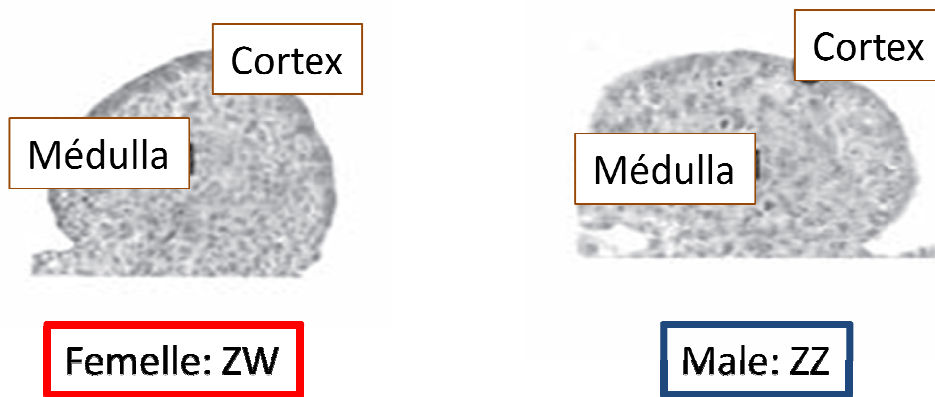
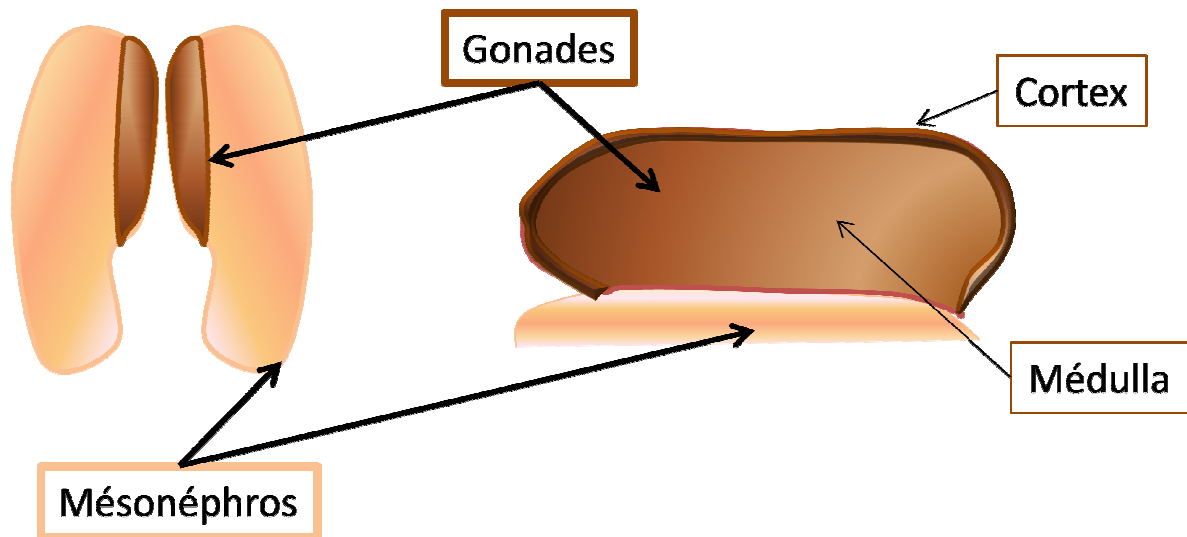


Figure 5 : la gonade indifférenciée (jour 3 à 6.5 d'incubation).

La gonade indifférenciée est composée d'un fin cortex et d'une médulla et est histologiquement similaire chez le mâle et la femelle.

Ainsi, chez le poulet, les cellules somatiques auraient une identité sexuelle autonome qui s'exprime avant le début de la différenciation gonadique. Cette identité sexuelle des cellules somatiques pourrait s'exprimer précocement dans la crête urogénitale et déclencher la cascade de gènes propre à la différenciation du testicule ou de l'ovaire. D'autre part, si le développement des caractères à dimorphisme sexuel se déroule indépendamment du développement gonadiques, il serait par la suite influencé par les hormones gonadiques (Zhao *et al.*, 2010). Ces récents travaux remettent en question, la recherche d'un déterminant majeur du sexe qui s'exprimerait spécifiquement dans la gonade au moment du début de la différenciation sexe-spécifique de la gonade.

Bien que l'existence d'un déterminant majeur du sexe n'ait pas été élucidée chez le poulet, plusieurs acteurs moléculaires ont été identifiés pour leur rôle dans les deux étapes majeures de la différenciation gonadique : la première étape consistant en la mise en place d'une gonade bipotentielle similaire dans les deux sexes qui dans un second temps se différencie en testicule ou en ovaire.

## II- La gonade indifférenciée

### 1- La morphologie

Chez le poulet, le système génital se met en place par épaissement du mésoderme intermédiaire autour de la région rénale, nommé mésenchyme néphrogène. Les expériences de chimères poulet-caille ont montré que les cellules du mésoderme intermédiaire (entre les somites 18 et 21) sont les principales sources des cellules gonadiques (Rodemer *et al.*, 1986). Ce mésenchyme néphrogène s'élargit et pénètre dans la cavité péritonéale (cœlome) pour former la crête néphrique séparée de l'épithélium cœlomique sous-jacent par une couche discontinue de laminine 1 (Sekido *et al.*, 2007). Cette crête néphrique participe à la mise en place du mésonéphros puis du métanéphros. Au jour 3 d'incubation (le développement embryonnaire du poulet s'effectuant en 21 jours), par épaissement à la surface ventromédiale du mésonéphros, apparaît la gonade primitive qui est histologiquement similaire dans les deux sexes entre les jours 3 et 6.5. Elle est constituée d'un fin épithélium (région corticale) et d'une région sous-jacente, la médulla, qui contient des groupes dispersés de cellules épithéliales séparées par des cellules mésenchymateuses. Le développement de la médulla se réalise grâce à la prolifération des cellules corticales qui pénètrent ensuite dans la région interne de la gonade (Merchant-Larios, 1984; Rodemer, 1986) (Figure 5).

Les précurseurs des cellules germinales primordiales sont détectés très précocement dans l'œuf fécondé au niveau de la zone centrale de l'aire pellucide (Kagami *et al.*, 1995; Kagami *et al.*, 1997b; Tagami *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007) et sont progressivement intégrées à l'hypoblaste (Karagenc *et al.*, 1996). En effet parallèlement à la formation de la ligne primitive, les cellules germinales primordiales se trouvent dans la région antérieure du croissant germinale (Ginsburg *et al.*, 1986). Au moment de la mise en place du système vasculaire, les cellules germinales primordiales pénètrent dans les vaisseaux par lesquels elles vont rejoindre la crête gonadique (Fujimoto *et al.*, 1976; Nakamura *et al.*, 1988; Kuwana *et al.*, 1999). La colonisation des gonades au jour 3.5, est plus importante dans la gonade gauche que dans la gonade droite des deux sexes (Van Limborgh, 1968; Zaccanti *et al.*, 1990); ceci constituant le signe précoce de l'asymétrie entre les deux gonades (cf. chapitre V-1 p38).

Chez les mammifères, la présence des cellules germinales est indispensable au développement ovarien (McLaren, 1988) en bloquant notamment la migration des cellules mésonéphriques (Yao *et al.*, 2003) qui sont indispensables à la formation des cordons testiculaires (Buehr *et al.*, 1993; Tilmann *et al.*, 1999). Et, si ces cellules germinales ne sont pas indispensables au développement du testicule, elles participent à cette différenciation (Adams *et al.*, 2002). Chez le poulet, la différenciation de la gonade mâle et femelle se réalise en absence des cellules germinales (McCarrey *et al.*, 1978, 1982). Ces cellules germinales primordiales deviennent des ovogonies au jour 8 d'incubation dans l'ovaire (Swift, 1915) et des spermatogonies au jour 13 dans les testicules (Swift, 1916).

A partir du jour 6.5-7, la gonade bipotentielle va se différencier en testicule ou en ovaire avec une différence majeure dans la zone qui va proliférer (Romanoff, 1960; Stahl *et al.*, 1973). Chez les individus ZZ, génétiquement mâles, la zone médullaire se développe avec la différenciation des tubes séminifères renfermant les cellules germinales tandis que chez les individus ZW, génétiquement femelles, la zone corticale va majoritairement se développer et contenir les cellules germinales.

## **2- Les principaux gènes impliqués**

La mise en place de la gonade bipotentielle implique un grand nombre d'acteurs moléculaires qui ont été identifiés chez les mammifères et chez certaines espèces de poissons. Mais dont seuls quelque uns des orthologues ont été étudiés chez le poulet et sont présentés dans la partie qui suit.

### **a- WT1**

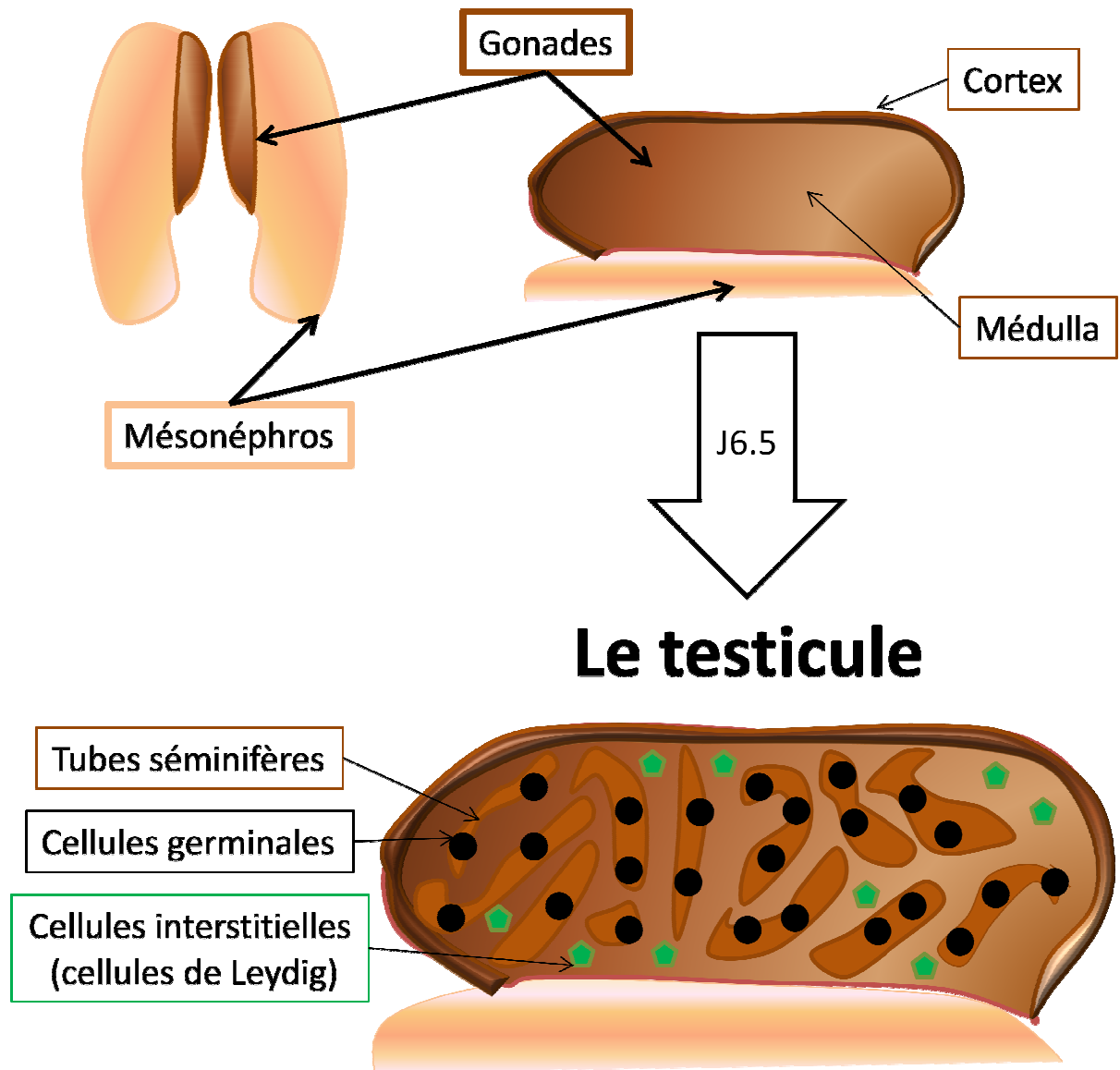
Le gène *WT1* (Wilm's tumour associated gene) est impliqué dans la mise en place de la gonade primitive chez les mammifères comme le montre l'invalidation de ce gène chez la souris qui induit une absence de développement des gonades et des surrénales (Hammes *et al.*, 2001). Chez le poulet, *WT1* est exprimé précocement (jour 4) dans l'épithélium cœlomique, dans le mésenchyme sous-jacent et au niveau des structures néphriques, zones qui constituent la région présomptive de la gonade suggérant une conservation de son rôle dans la mise en place de la gonade primitive (Kent *et al.*, 1995; Oreal *et al.*, 2002). Après le début de la différenciation gonadique (jour 6.5-7), *WT1* est exprimé dans les gonades des deux sexes sans dimorphisme sexuel d'expression apparent (Oreal *et al.*, 2002).

### **b- LHX9**

*LHX9* est un gène de la famille des gènes à homéoboites LIM dont l'invalidation chez la souris conduit à une agénésie gonadique suite à l'absence de migration des cellules mésonéphriques (Birk *et al.*, 2000). Chez le poulet, ce gène est exprimé dans une zone restreinte de l'épithélium cœlomique au jour 4 d'incubation marquant ainsi la zone présomptive de la gonade puisque par la suite son expression est détectée uniquement dans les régions corticales des gonades des deux sexes (Oreal *et al.*, 2002). Au moment de l'éclosion, l'expression de ce gène est absente du testicule et est retrouvée dans la couche de cellules qui entourent les ovocytes (Oreal *et al.*, 1998; Mazaud *et al.*, 2002).

### **c- NR5A1**

*NR5A1*, *SF1* (Steroidogenic Factor 1) ou *Ad4BP* code pour un récepteur nucléaire orphelin identifié chez les mammifères pour être un régulateur de l'expression des cytochromes P450 impliqués dans la stéroïdogénèse (Morohashi *et al.*, 1992; Honda *et al.*, 1993). D'autre part, ce gène est impliqué dans la mise en place des organes stéroïdogènes que sont les glandes surrénales et les gonades comme le montre l'absence de ces organes suite à l'invalidation de ce gène chez la souris (Luo *et al.*, 1994). Cependant, chez la souris, le développement de l'ovaire semble se dérouler en absence de stéroïdogénèse suggérant que le rôle de SF1 est indépendant de son action régulatrice sur les enzymes de la stéroïdogénèse (Grumbach, 1992).



**Figure 6 : la différenciation testiculaire.**

A partir du jour 6.5 d'incubation, le testicule se développe par une prolifération importante de la zone médullaire dans laquelle sont retrouvés les tubes séminifères (cellules de Sertoli et cellules germinales). Tandis que dans le compartiment interstitiel sont retrouvées les cellules de Leydig.

Chez les mammifères, *SFI* est exprimé par les crêtes urogénitales dans les deux sexes puis son expression décline dans la gonade femelle tandis qu'elle se maintient dans les gonades mâles (Ikeda *et al.*, 1994).

Chez le poulet, l'orthologue de *SFI* (Kudo *et al.*, 1997) est exprimé dans la crête urogénitale au jour 3.5-4.5 (Smith *et al.*, 1999b; Oreal *et al.*, 2002) mais son expression est plus importante dans la région présomptive des glandes surrénales que dans celle des gonades primitives (Oreal *et al.*, 2002). La région de l'épithélium cœlomique exprimant *LHX9* (marquant la zone présomptive de la gonade) contient quelques cellules exprimant *SFI*, suggérant que comme chez la souris *LHX9* serait nécessaire à la prolifération de la population de cellules exprimant *SFI* (Birk *et al.*, 2000). Au jour 5, les gonades indifférenciées des deux sexes expriment *SFI* sans dimorphisme sexuel apparent (Oreal *et al.*, 2002).

Après l'éclosion, *SFI* est exprimé dans l'épithélium sertolien des testicules ainsi que dans les cellules des follicules qui se sont mis en place au sein du cortex ovarien mais également de manière dispersée dans le cortex et la médulla de l'ovaire (Oreal *et al.*, 2002).

### III- Le développement testiculaire

#### 1- La morphologie

Malgré une large variabilité dans le déterminisme du sexe chez les vertébrés, le testicule adulte des différentes espèces est similaire de par sa morphologie, son organisation cellulaire ou encore sa physiologie. La différenciation de la gonade mâle est marquée par le développement de la zone médullaire et de ses cordons qui vont progressivement donner les tubes séminifères. La zone corticale ne se développe pas et sera composée d'une couche unique de cellules épithéliales. Les tubes séminifères sont composés des cellules germinales et de leurs cellules de soutien que sont les cellules de Sertoli. Ces tubes sont entourés par une couche de cellules péritubulaires myoïdes. Les cellules stéroïdiennes que sont les cellules de Leydig, sont présentes dans l'interstitium entre les cordons le long de vaisseaux sanguins et autres cellules conjonctives. De plus, le développement testiculaire est marqué par le développement d'une albuginée qui entoure la gonade (Figure 6).

Chez le poulet, les premiers cordons médullaires se mettent en place de manière désorganisée à partir du jour 6 d'incubation qui deviennent parfaitement délimités par une couche de laminine de type 1 après le jour 7.

Chez la souris, la migration des cellules de l'épithélium cœlomique vers l'intérieur de la gonade participe à la différenciation du testicule (Sekido *et al.*, 2007). Dans un premier temps, la migration de ces cellules est indépendante du sexe puis devient plus importante dans la gonade mâle après le début de l'expression de *SRY* (Karl *et al.*, 1998). Une partie de ces cellules vont devenir des cellules de Sertoli tandis que d'autres vont rester en dehors des tubes séminifères. Suite au déclin de l'expression de *SRY*, la laminine de type 1 devient continue empêchant dès lors la migration de ces cellules vers la gonade.

De façon similaire, chez le poulet, il est observé une migration des cellules de l'épithélium cœlomique mais ces cellules n'expriment ni les marqueurs des cellules de Sertoli (*AMH*, *SOX9*) ni le marqueur des cellules de Leydig (*HSD3B1*) (Sekido *et al.*, 2007).

Chez les mammifères, il existe également une migration des cellules du mésonéphros qui apparaît après le début de l'expression de *SRY* (Buehr *et al.*, 1993; Martineau *et al.*, 1997) et qui vont contribuer à la différenciation des cellules conjonctives myoïdes, des cellules endothéliales et des cellules interstitielles comme les cellules de Leydig (Merchant-Larios *et al.*, 1998; Nishino *et al.*, 2001).

Chez le poulet, le marquage des cellules du mésonéphros au jour 3 est visible par la suite au jour 8 dans les gonades des deux sexes, suggérant que cette migration n'est pas mâle-spécifique (Sekido *et al.*, 2007). Cependant, la co-culture des gonades de poulet (jour 6) avec le mésonéphros de caille, montre que la migration des cellules mésonéphriques n'a lieu que dans la gonade mâle (Smith *et al.*, 2005). Ainsi, il pourrait y avoir deux salves de migration des cellules du mésonéphros : une première qui est sexe-indépendante et une seconde, plus tardive, qui serait mâle-spécifique. Cependant, contrairement aux mammifères, la migration des cellules mésonéphriques n'est pas indispensable au développement des cordons testiculaires. En effet, l'inhibition de la voie de signalisation des PDGF (Platelet derived growth factor) impliquée dans la migration de ces cellules, n'entraîne pas de désorganisation des cordons testiculaires chez le poulet (Smith *et al.*, 2005). En outre, le développement des gonades des deux sexes se déroule correctement suite à l'ablation *in ovo* du mésonéphros (Merchant-Larios, 1984). Ces cellules issues du mésonéphros expriment les marqueurs des cellules de Sertoli (*AMH*, *SOX9*) ainsi que le marqueur des cellules de Leydig (*HSD3B1*). Ainsi, les cellules de Sertoli auraient une origine différente chez les mammifères (épithélium cœlomique) et chez le poulet (mésonéphros).



Ainsi, malgré une origine différente, les cellules à l'origine des cellules de Sertoli expriment au préalable *SFI* dans ces deux espèces suggérant une conservation des mécanismes de différenciation (Smith *et al.*, 1999a; Oreal *et al.*, 2002; Sekido *et al.*, 2007).

## 2- Les principaux gènes impliqués

### a- *AMH*

L'*AMH* (Anti-Müllerian Hormone) ou MIS (Müllerian Inhibiting Substance) est une glycoprotéine de la famille des TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta). Chez les mammifères, l'expression de l'*AMH* apparaît suite à l'expression du gène *SRY* et au moment où l'expression de ce gène est à son maximum (Hacker *et al.*, 1995). Ce gène est spécifiquement exprimé par les cellules de Sertoli et est impliqué dans la régression des canaux de Müller à l'origine du tractus génital femelle (Munsterberg *et al.*, 1991). D'autre part, il influencerait également la fonction des cellules de Leydig (Racine *et al.*, 1998). Chez les mammifères, au cours du développement embryonnaire seule la gonade mâle exprime l'*AMH*; les cellules de granulosa exprime également l'*AMH* mais uniquement après la naissance.

Chez le poulet, à la différence des mammifères, les transcrits (Eusebe *et al.*, 1996) et la protéine (Hutson *et al.*, 1981; Teng *et al.*, 1987; di Clemente *et al.*, 1992) sont détectés au cours de la différenciation dans les gonades des deux sexes. Ainsi, si l'expression de l'*AMH* est gonade-spécifique, elle n'est pas sexe-spécifique. Cette expression débute au même stade, au jour 4 (HH25), dans les gonades des deux sexes et est retrouvée dans la région interne de la gonade de manière dispersée et est absente de l'épithélium cortical (Oreal *et al.*, 1998; Oreal *et al.*, 2002). Cependant, les cellules exprimant l'*AMH* sont plus nombreuses dans les gonades males, signe précoce de dimorphisme sexuel, deux jours avant le début de la différenciation gonadique. De façon intéressante, il y a co-localisation de l'expression de l'*AMH* et de *DMRT1* dans la gonade mâle suggérant la possibilité d'une activation de l'*AMH* par *DMRT1* (Oreal *et al.*, 2002). De même au moment de l'éclosion, les cellules exprimant l'*AMH* expriment également *WT1* et *GATA4* (Oreal *et al.*, 2002) qui sont des facteurs agissant en synergie chez les mammifères pour activer le promoteur de l'*AMH* (Nachtigal *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 2001).

Chez la femelle, les cellules exprimant l'*AMH* sont dispersées dans la médulla et les niveaux qui sont plus faibles que dans les gonades males, sont similaires dans la gonade gauche et la gonade droite (Oreal *et al.*, 1998; Vaillant *et al.*, 2001b; Oreal *et al.*, 2002). Au

cours du développement ovarien, les cellules exprimant l'*AMH* se retrouvent dans la région médullaire qui se situe sous le cortex (Eusebe *et al.*, 1996; Oreal *et al.*, 2002). Il est supposé que le développement important du cortex joue un rôle dans ce phénomène puisque dans la gonade droite où le cortex ne se développe pas, l'expression de l'*AMH* reste dispersée dans la médulla. Après l'éclosion, les cellules folliculaires expriment l'*AMH* comme chez les mammifères (Oreal *et al.*, 2002) mais cette expression est également présente dans les cellules interstitielles du cortex.

L'étude du promoteur de l'*AMH* de poulet montre la présence d'éléments de réponses à SF1 (*NR5A1*), aux SOX et aux œstrogènes laissant supposer que ces acteurs peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'expression de ce gène (Oreal *et al.*, 1998). SF1 est un régulateur de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'*AMH* des mammifères *in vitro* et *in vivo* (Shen *et al.*, 1994; Giuili *et al.*, 1997; Arango *et al.*, 1999). Néanmoins, au jour 5, l'expression de SF1 chez le poulet n'est pas restreinte aux cellules exprimant l'*AMH* ni chez le mâle ni chez la femelle (Oreal *et al.*, 2002) suggérant que SF1 n'est pas suffisant pour induire cette expression.

De plus, l'augmentation de l'expression de l'*AMH* à partir du jour 7 chez le mâle, se fait en absence d'une augmentation de l'expression de SF1 qui reste constante au cours du développement testiculaire chez le poulet (Smith *et al.*, 1999b).

### ***b- SOX9***

*SOX9* est un gène autosomal chez les mammifères et est le 1<sup>er</sup> gène identifié en aval de SRY dans la cascade de gènes impliqués dans la différenciation de la gonade mâle. Ce gène est nécessaire et suffisant pour induire la différenciation du testicule (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 2001). *SOX9* active le promoteur de l'*AMH* *in vitro* (De Santa Barbara *et al.*, 1998) et *in vivo* (Arango *et al.*, 1999).

Chez le poulet, l'expression de *SOX9* est observée dans le mésonéphros des deux sexes et dans la gonade mâle. Aucune expression n'est détectée dans la gonade femelle ainsi contrairement à l'*AMH* ce gène est spécifique du testicule. Le début de l'expression de *SOX9* est détecté au jour 6.5 et son expression augmente considérablement dans la gonade mâle à partir du jour 7 mais est postérieure au début de l'expression de l'*AMH* (Oreal *et al.*, 2002). Ainsi, chez le poulet, contrairement aux mammifères, *SOX9* ne peut être le déclencheur de l'expression de l'*AMH* d'autant plus que la gonade femelle exprime l'*AMH* en absence de *SOX9*. La présence des éléments de réponses aux SOX présents dans le promoteur de l'*AMH*

(Eusebe *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 2005) n'exclut pas que *SOX9* puisse par la suite moduler l'expression de l'*AMH* car ceux sont les mêmes cellules qui expriment ces deux gènes (Oreal *et al.*, 2002).

Par ailleurs, chez l'alligator américain (qui présente un déterminisme du sexe lié à la température), l'expression de *SOX9* apparaît après le début de l'expression de l'*AMH*, à la fin de la période de sensibilité à la température suggérant également que *SOX9* n'induit pas l'expression de l'*AMH* et a un rôle plus tardif dans le développement testiculaire (Western *et al.*, 1999a, b). Dès lors, il semblerait que c'est tardivement au cours de l'évolution que *SOX9* acquiert un rôle précoce dans la cascade de gènes impliqué dans la différenciation du testicule.

De plus la présence d'éléments de liaison aux domaines DM dans la promoteur de *SOX9* (présents également chez l'ornithorynque mais absent chez la souris, l'Homme, l'opossum ou la grenouille) (Bagheri-Fam *et al.*, 2010) et la diminution de son expression suite à l'inhibition par Knock-down de *DMRT1* suggèrent que chez le poulet, l'expression de *SOX9* puisse être régulée par *DMRT1* (Smith *et al.*, 2009a).

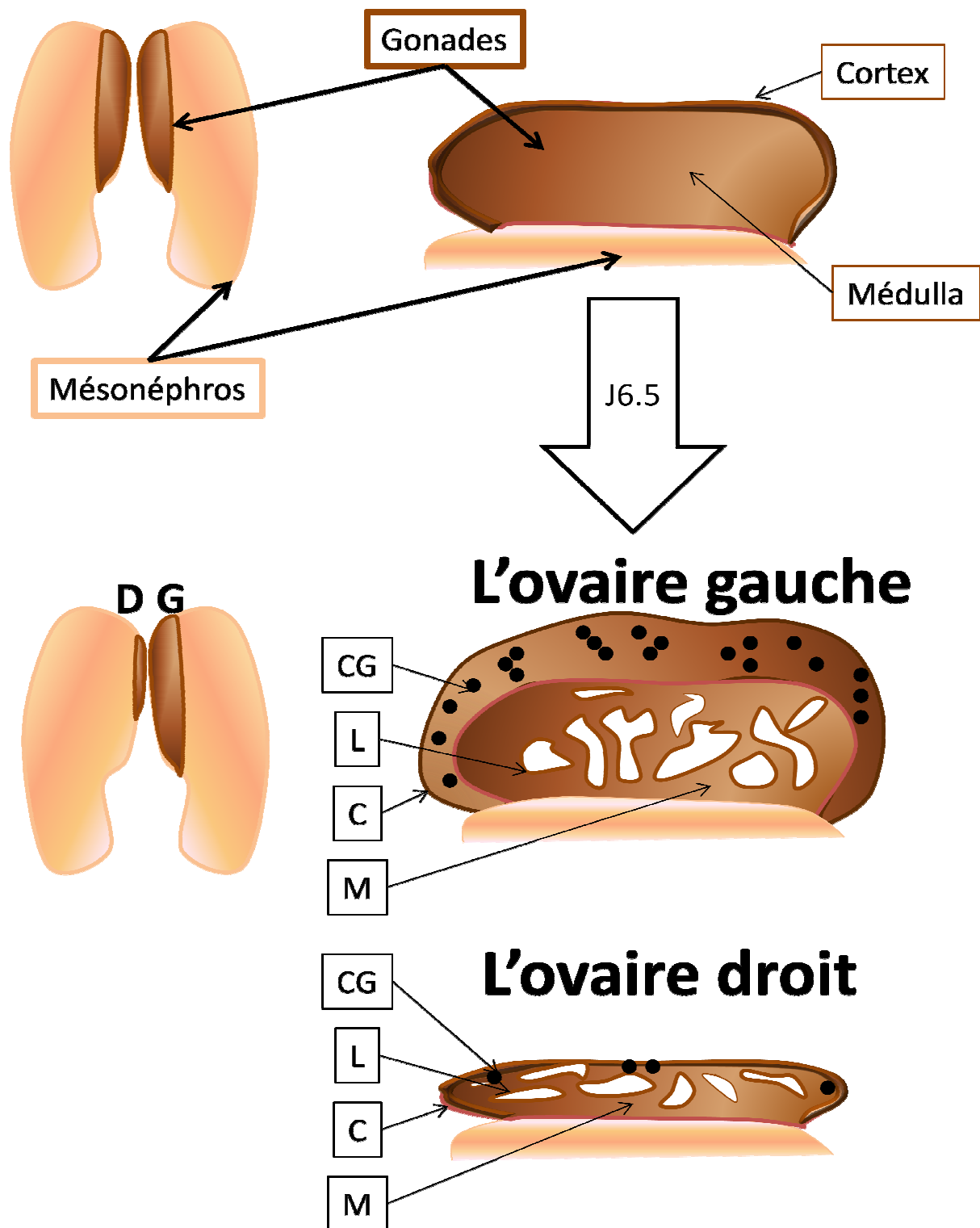


Figure 7 : le développement ovarien.

A partir du jour 6.5, l'ovaire gauche se développe avec une prolifération importante de la région corticale (C) qui contient les cellules germinales (CG) tandis que la médulla (M) comporte des lacunes (L). L'ovaire droit régresse progressivement en absence du développement de son cortex. Dans cet ovaire droit, les cellules germinales sont en région sous corticale et sont apoptotiques.

Le développement testiculaire chez le poulet est comme chez les mammifères marqué par la mise en place des cordons médullaires suite à la différenciation des cellules de Sertoli. Cependant de nombreuses différences confèrent au modèle poulet sa singularité. Ainsi, les cellules de Sertoli n'ont pas la même origine cellulaire que celles des mammifères et le mésonéphros n'est pas indispensable au développement de la gonade mâle. D'autre part, chez les mammifères, le testicule comporte une artère testiculaire qui participerait à l'édification des cordons séminifères (Martineau *et al.*, 1997; Brennan *et al.*, 2002) or ce vaisseau est absent du testicule du poulet. De plus, malgré le faible nombre de gènes identifiés comme étant impliqués dans la voie mâle chez le poulet, le fait que *SOX9* ne soit pas en amont de l'expression de l'AMH renforce l'idée que le poulet est un modèle singulier dont l'étude participe à la compréhension des mécanismes évolutifs de la différenciation testiculaire.

## **IV- Le développement ovarien**

### **1- La morphologie**

La différenciation de l'ovaire chez le poulet est marquée par un fort développement de la région corticale (contenant les cellules germinales) par prolifération des cellules somatiques. Les cordons de la région médullaire vont progressivement former des espaces vides appelés vacuoles ou lacunes qui sont de petites tailles dans la zone sous-corticale et de tailles plus importantes dans la région profonde de la médulla. L'épithélium qui forme les vacuoles est fin et plat. Dans l'embryon de poulet femelle, seule la gonade gauche va se développer complètement afin de donner un ovaire fonctionnel. La gonade droite commence à croître et va progressivement régresser donnant un tissu rudimentaire qui 70 jours post-éclosion ne sera pratiquement plus visible. La médulla de la gonade droite pendant le développement embryonnaire ressemble à celle de l'ovaire gauche, cependant il n'y a pas de développement du cortex qui est remplacé par un fin épithélium. De plus seul le canal de Müller gauche se développe pour donner l'oviducte alors que le droit régresse sauf dans sa partie postérieure (Figure 7). La différenciation asymétrique des ovaires est développée dans le chapitre V-1 p38.

### **2- L'entrée en méiose des cellules germinales**

Chez les mammifères, les cellules germinales s'incorporent dans la gonade mâle au niveau des tubes séminifères pendant la vie embryonnaire et vont subir de nombreuses mitoses en restant au stade de spermatogonies (McLaren, 2003). Il est supposé que cette mise

en quiescence des spermatogonies est assurée par un signal émis par les cellules de Sertoli (McLaren *et al.*, 1997). Au contraire, les cellules germinales femelles vont entrer en méiose pendant la vie embryonnaire et s'arrêter en prophase de la première division méiotique correspondant au stade « ovocyte I ». Il est intéressant de noter que les cellules germinales des deux sexes peuvent entrer en méiose lorsqu'elles sont placées de manière ectopique par exemple dans les glandes surrénales (Zamboni *et al.*, 1983) ou lorsqu'elles sont placées en culture (Chuma *et al.*, 2001). Il apparaît donc que les cellules germinales entrent en méiose à partir du moment où elles ne sont pas enfermées dans les cordons testiculaires. Soit ces cellules sont soumises à un signal inhibiteur spécifique aux cellules de Sertoli, soit elles sont soumises à un signal ovarien également présent dans les autres sites ectopiques.

Il a récemment été mis en évidence chez la souris que ce signal ovarien serait l'acide rétinoïque (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006).

Chez le poulet, les cellules germinales ont un site originel extra-gonadique et elles vont migrer vers la gonade via le système circulatoire avec une plus forte colonisation à gauche qu'à droite (Fujimoto *et al.*, 1976). Du jour 8 au jour 13, la forte prolifération des cellules somatiques et germinales dans la gonade femelle contraste avec la faible activité mitogène des cellules dans la gonade mâle (Hughes, 1963; Mendez *et al.*, 2005). Dans le cortex ovarien gauche, les cellules germinales forment des nids dont les divisions sont synchrones et visibles à partir de J10 avec une augmentation par 25 du nombre de cellules germinales entre J9 et J17 (Hughes, 1963). Dans la gonade femelle droite, il n'y a pas de développement du cortex, les cellules germinales vont se multiplier dans la région médullaire sous-jacente mais vont rapidement entrer en apoptose (Ukeshima *et al.*, 1991).

Chez le poulet comme chez les mammifères, les cellules germinales entrent en méiose chez la femelle pendant la vie embryonnaire (Wylie, 1972; Civinini *et al.*, 1986; Ukeshima *et al.*, 1991) entre J14 et J18 du développement embryonnaire.

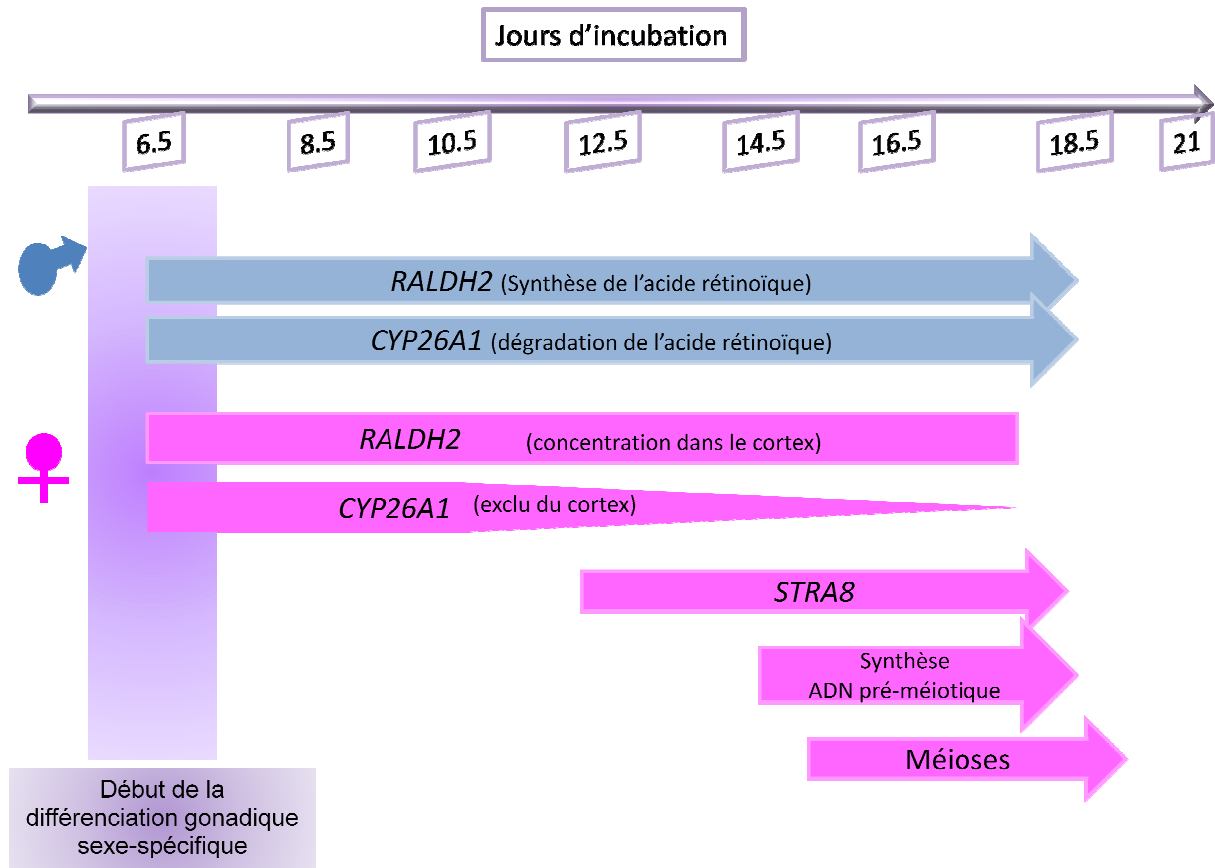


Figure 8 : l'entrée en méiose des cellules germinales.

La gonade mâle (bleu) exprime *CYP26A1* et *RALDH2I*, sans mise en place de la méiose pendant le développement embryonnaire. Dans l'ovaire gauche (rose), *RALDH2* est exprimé dans le cortex en développement. L'expression de *CYP26A1* décline après le jour 10.5 et est exclu du cortex. Au jour 12.5, l'expression de *STRA8* augmente dans le cortex gauche. A partir du jour 15, il ya la synthèse d'ADN préalable à la méiose qui sont histologiquement visible après le jour 15.5.

SCP3 (Synaptonemal complex 3) est un marqueur des cellules germinales en méiose et son expression chez le poulet débute au jour 15.5 pour s'étendre plus largement aux jours 16.5 et 17.5; indiquant que l'entrée en méiose chez le poulet n'est pas un événement synchrone mais qui s'étend sur plusieurs jours (Hughes, 1963). Tandis que certaines cellules germinales entrent en méiose, d'autres peuvent poursuivre leurs mitoses jusqu'au stade J17 (Erickson, 1974). A la différence de la souris où les divisions méiotiques débutent peu de temps après le début de la différenciation des cellules somatiques, chez le poulet, l'entrée en méiose (jour 15.5) se produit bien après le début de la différenciation des cellules somatiques (jour 6.5).

*STRA8* est un marqueur des cellules pré-méiotiques et est chez la souris nécessaire à la synthèse d'ADN préalable à la 1<sup>ère</sup> division de la méiose (Baltus *et al.*, 2006). L'expression de *STRA8* apparaît à partir de J12.5 dans les cellules germinales peuplant le cortex ovarien gauche chez le poulet (Smith *et al.*, 2008a), suggérant que comme chez les mammifères *STRA8* serait nécessaire à l'entrée en méiose (Figure 8). Il est intéressant de noter que l'expression de *STRA8* n'est pas retrouvée dans les gonades femelles droites, cohérent avec l'absence de cellules germinales en méiose dans ces gonades. Il a été montré que l'acide rétinoïque synthétisé par *RALDH2* (Retinaldehyde dehydrogenase type 2) (Haselbeck *et al.*, 1999) déclençait l'entrée en méiose chez l'embryon de souris femelle et que la dégradation par *CYP26B1* de l'acide rétinoïque préviendrait de cette entrée en méiose dans les embryons males (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006).

*RALDH2* et *CYP26B1* sont également les enzymes majeures qui régulent la production d'acide rétinoïque chez le poulet (Berggren *et al.*, 1999; Swindell *et al.*, 1999; Blentic *et al.*, 2003). Ces deux enzymes sont exprimées de façon concomitante dans le testicule embryonnaire de poulet, ne permettant pas ainsi l'accumulation de l'acide rétinoïque. Chez la femelle, il y a une expression maintenue de *RALDH2* dans le cortex gauche et une diminution à partir de jour 10.5 de l'expression de *CYP26B1* c'est-à-dire avant et pendant l'expression de *STRA8* (Smith *et al.*, 2008a). Cependant, l'expression de *RALDH2* apparaît entre le jour 8.5 et 10.5 dans le cortex ovarien gauche alors que *STRA8* n'apparaît qu'au jour 12.5 laissant supposer que l'activation par l'acide rétinoïque de *STRA8* n'est pas directe (Smith *et al.*, 2008a). Une autre hypothèse serait que l'acide rétinoïque synthétisé par le cortex est dirigé vers la médulla où est exprimé *CYP26B1* et donc l'acide rétinoïque ne s'accumule dans le cortex qu'au moment où l'enzyme de dégradation *CYP26B1* diminue c'est-à-dire après jour 12.5.



### 3- Les principaux gènes impliqués

#### a- *DAX1*

*DAX1* (Dosage Sensitive Sex Reversal-Adrenal Hypoplasia Congenita critical region on the X chromosome, gene 1) ou *NROB1* est un récepteur nucléaire orphelin dont le gène est porté par le chromosome X chez les mammifères. Ce gène est connu chez les mammifères pour être impliqué dans la mise en place des gonades et des glandes surrénales (Muscatelli *et al.*, 1994; Zanaria *et al.*, 1994).

Chez l'Homme, une duplication anormale de ce gène, chez les individus XY, entraîne une absence de développement testiculaire et une inversion mâle-femelle (Bardoni *et al.*, 1994) suggérant que *DAX1* serait un déterminant ovarien. Néanmoins, cette inversion du sexe n'est complète qu'en présence d'un allèle hypomorphique de *SRY* indiquant que si *DAX1* est un facteur ovarien celui-ci n'est pas dominant (Swain *et al.*, 1996; Swain *et al.*, 1998).

Chez la souris, l'expression de *DAX1* est supérieure dans l'ovaire où elle augmente entre les jours 12.5 et 14.5 avant de diminuer tandis que cette expression chez le mâle, décline peu après le pic d'expression de *SRY* et augmente à nouveau dans les cellules interstitielles entre les jours 13.5 et 17.5 (Swain *et al.*, 1996). L'invalidation de ce gène chez les souris XX, ne perturbe pas le développement de l'ovaire suggérant que ce facteur serait un facteur « anti-testiculaire » plutôt qu'un facteur promouvant le développement de l'ovaire (Yu *et al.*, 1998). De plus, l'invalidation de ce gène chez des souris XY, entraîne une perturbation du maintien de l'épithélium germinale, de la spermatogénèse, de la prolifération des cellules péri-tubulaires myoïdes ainsi que des perturbations de migration et de formation des cellules de Leydig. Chez ces souris *DAX1*<sup>-/-</sup>, il y a une augmentation des niveaux de *CYP19* dans les cellules de Leydig. Or chez les souris surexprimant l'aromatase (AROM+), les cellules de Leydig sont hyperplasiques et il y a des anomalies des tubes séminifères (Li *et al.*, 2001). Donc l'invalidation de *DAX1* entrainerait une augmentation de synthèse de l'aromatase rendant hyperplasiques les cellules de Leydig qui sont chez le mâle le site majeur de l'expression de *DAX1* (Ikeda *et al.*, 1996; Majdic *et al.*, 1996; Swain *et al.*, 1996). Les effets de *DAX1* sur les cellules de Leydig pourraient également intervenir via une régulation de la stéroïdogénèse puisque *DAX1* est inhibiteur des effets de SF1 sur l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse: STAR, HSD3B1, CYP11, CYP17 et CYP19 (Parker *et al.*, 1997; Sandhoff *et al.*, 1998; Lalli *et al.*, 2003).

Afin de concilier les expériences d'inactivation de DAX1 et les expériences de surexpression de ce gène, il est envisagé que DAX1 serait soumis à un effet de dosage et agirait avec une fenêtre temporelle précise. Ainsi, selon la dose et le moment de l'expression, il favoriserait le développement testiculaire ou ovarien (Ludbrook *et al.*, 2004).

Chez le poulet, *DAX1* est localisé sur le bras long du chromosome 1 et n'est donc pas lié aux chromosomes sexuels (Smith *et al.*, 2000). Ce gène est exprimé dans les gonades indifférenciées des deux sexes aux jour 5.5-6.5 (Smith *et al.*, 2000). Son expression étant, comme chez les mammifères, plus importante dans la gonade femelle. L'expression de DAX1 augmente dans les deux sexes au cours du développement gonadique mais après le jour 8.5 l'expression décline dans la gonade mâle (Smith *et al.*, 2000); profils similaires à ceux observé chez les mammifères (Swain *et al.*, 1996). *DAX1* pourrait jouer un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse qui est plus importante dans l'ovaire (Guichard *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 2000). D'autre part, il pourrait limiter l'expression de l'*AMH* dans les gonades femelles car chez les mammifères DAX1 limite les effets synergiques de SF1 et WT1 sur l'activité du promoteur de l'*AMH* (Tremblay *et al.*, 2001)

#### ***b- CYP19A1***

Le gène *CYP19A1* code pour l'aromatase, enzyme terminale de la voie de synthèse des œstrogènes. Son expression dans la gonade femelle coïncide avec le début de la différenciation gonadique (jour 5-6) alors qu'elle est absente dans la gonade mâle (Yoshida *et al.*, 1996; Andrews *et al.*, 1997; Nakabayashi *et al.*, 1998; Nishikimi *et al.*, 2000; Kamata *et al.*, 2004). Ce gène s'exprime dans la médulla des ovaires gauches et droits. L'œstradiol est détecté chez la femelle par dosage radio-immunologique dès le jour 7.5 (Guichard *et al.*, 1973; Guichard *et al.*, 1977a; Guichard *et al.*, 1977b; Teng *et al.*, 1977; Guichard *et al.*, 1979; Scheib *et al.*, 1981) et sa synthèse est indispensable au développement du cortex qui est la caractéristique du développement ovarien (Scheib, 1983). L'implication des stéroïdes dans le développement de la gonade est développée dans le chapitre V-2 p42.

#### ***c- FOXL2***

Le gène *FOXL2* (Forkhead Box L2) est un gène impliqué dans les syndromes humains BPES (Blepharophimosis-Ptois-Epicanthus-inversus Syndrome) qui se caractérisent par des anomalies dans la formation des paupières associées dans certains cas à des insuffisances ovariennes précoces (Crisponi *et al.*, 2001).

De façon similaire, chez la souris l'invalidation à l'état homozygote de ce gène entraîne également une insuffisance ovarienne précoce (Schmidt *et al.*, 2004). D'autre part, chez la chèvre, il existe des cas d'inversions du sexe XX: femelle → mâle qui sont liés à des mutations de la région PIS (Polled Intersex Syndrome); cette mutation entraînant une diminution de l'expression de *FOXL2* (Pailhoux *et al.*, 2001). Chez les chèvres PIS<sup>-/-</sup>, l'expression de *FOXL2* décline au jour 36 de gestation et est accompagnée d'une diminution de l'expression de *CYP19* codant pour l'aromatase (Pailhoux *et al.*, 2002).

L'expression de *FOXL2* présente un profil femelle-spécifique chez de nombreux vertébrés: la souris (Pannetier *et al.*, 2005); l'humain (Cocquet *et al.*, 2002), le poulet (Govoroun *et al.*, 2004), les tortues (Loffler *et al.*, 2003) ou encore les poissons (Baron *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). *FOXL2* est un activateur de la transcription de *CYP19A1* dans les cellules de granulosa adultes de brebis, (Pannetier *et al.*, 2006) et de façon similaire chez le poisson tilapia (Wang *et al.*, 2007). De même, il est activateur de la transcription du récepteur au GNRH (Gonadotropin releasing Hormone) dans l'hypophyse (Ellsworth *et al.*, 2003) tandis qu'il est répresseur de la transcription du gène *STAR* dans l'ovaire adulte (Pisarska *et al.*, 2004).

Au cours du développement gonadique embryonnaire chez le poulet, *FOXL2* présente une expression sexuellement dimorphique. En effet, le transcrit du gène est détecté dans les gonades dès le jour 5 avec une expression 10 à 250 fois plus élevée chez la femelle (Govoroun *et al.*, 2004). Par hybridation *in situ*, les ARNm de *FOXL2* ne sont pas détectés chez le mâle avant, pendant ou après le début de la différenciation gonadique (Hudson *et al.*, 2005). La protéine *FOXL2* est détectée à partir du jour 7 dans la médulla de l'ovaire qui est également le lieu d'expression de l'aromatase (Govoroun *et al.*, 2004) suggérant ainsi que comme dans les cellules de granulosa de brebis, *FOXL2* pourrait être un activateur de la transcription du gène *CYP19A1*. Cependant, dans les ovaires embryonnaires de chèvre, toutes les cellules exprimant *FOXL2* n'expriment pas toutes *CYP19* indiquant que *FOXL2* n'est pas suffisant pour induire l'expression de l'aromatase (Pannetier *et al.*, 2006). De plus dans l'ovaire de poulet post-éclosion, *FOXL2* est exprimé majoritairement par les cellules de granulosa et faiblement par les cellules de la thèque (Govoroun *et al.*, 2004) tandis que *CYP19A1* est exprimée par les cellules de la thèque dans les follicules en formation (Oreal *et al.*, 2002) et dans les cellules de la thèque externe dans les follicules en croissance (Kato *et al.*, 1995). Ainsi, *FOXL2* pourrait réguler la transcription de *CYP19A1* dans l'ovaire

embryonnaire mais il ne serait pas indispensable à l'expression de *CYP19A1* dans l'ovaire adulte.

Après inhibition de la synthèse des œstrogènes par un inhibiteur de l'aromatase dans les gonades embryonnaires, il est observé une diminution de l'expression de *FOXL2* (Hudson *et al.*, 2005) suggérant une régulation par les œstrogènes ou une régulation indirecte par *DMRT1* ou *SOX9* dont l'expression augmente après l'inhibition de la synthèse des œstrogènes (Smith *et al.*, 2003). D'autre part, le knock-down de *DMRT1* chez les individus ZZ induit une forte augmentation de l'expression de *CYP19A1* et de *FOXL2* (Smith *et al.*, 2009a). Ainsi *DMRT1* inhiberait l'expression de l'aromatase dans les gonades ZZ permettant un développement du testicule et cette inhibition pourrait passer par une inhibition de l'expression de *FOXL2* sauf si celle-ci est la conséquence de la diminution des œstrogènes (Hudson *et al.*, 2005).

#### **d- NR5A1**

Le promoteur de *CYP19A1* de poulet comporte des éléments de réponse à SF1 (Kudo *et al.*, 1997) suggérant que comme chez les mammifères SF1 pourrait réguler l'expression de ce gène (Fitzpatrick *et al.*, 1993; Lynch *et al.*, 1993). De façon cohérente avec cette hypothèse, l'expression de *SF1* augmente après le jour 7 dans la gonade femelle de poulet tandis que son expression reste modérée dans la gonade mâle (Smith *et al.*, 1999b). Mais néanmoins SF1 n'est pas suffisant pour induire l'expression de *CYP19A1* car son expression débute 3 jours avant celui du gène codant pour l'aromatase (Smith *et al.*, 1999b). D'autre part, au jour 14 d'incubation, *SF1* est exprimé dans la médulla de l'ovaire dans la même région que celle où s'exprime l'*AMH* et *CYP19A1* mais également dans la région profonde de la médulla où l'expression de ces deux gènes est faible, suggérant que SF1 n'est pas suffisant pour induire ni l'expression de l'*AMH* ni celle de *CYP19A1* (Oreal *et al.*, 2002). De façon similaire au poulet, chez l'alligator américain où le déterminisme du sexe est induit par la température, *SF1* est plus exprimé dans l'ovaire au cours de la période de sensibilité à la température (Western *et al.*, 2000). Cependant chez l'espèce de tortue *trachemys scripta*, SF1 est plus exprimé dans le testicule (Fleming *et al.*, 1999) or dans ces espèces comme chez le poulet l'activité stéroïdienne est plus importante dans l'ovaire. Dés lors, le rôle de SF1 dans la différenciation des gonades des vertébrés inférieurs n'est pas complètement élucidé et ne semble pas se restreindre à une régulation de la stéroïdogénèse (Western *et al.*, 2001).

### e- *RSPO1*

*RSPO1* est un gène codant pour la protéine R-spondin1 qui active les récepteurs FZD/LRP (Frizzled/LDL receptor related protein) (Nam *et al.*, 2006). La liaison à ces récepteurs entraînant l'accumulation cytoplasmique des  $\beta$ -caténines ou leur translocation nucléaire afin d'activer la transcription de gènes cibles (Kim *et al.*, 2006).

La mutation de ce gène est responsable chez l'humain de cas d'inversion du sexe 46XX: femelle en mâle (Parma *et al.*, 2006). En effet, chez ces individus XX, la gonade se différencie en testicule en absence de SRY, suggérant un rôle important de *RSPO1* dans le développement de l'ovaire.

De plus, l'invalidation de ce gène chez la souris entraîne le développement de gonades masculinisées avec une déplétion en cellules germinales et des défauts de méiose, une vascularisation proche de la vascularisation mâle-spécifique ainsi qu'une production de testostérone (Chassot *et al.*, 2008b; Tomizuka *et al.*, 2008). La déplétion en cellules germinales est visible à partir du jour 14.5; cependant l'invalidation du gène n'affecte pas la voie de l'acide rétinoïque suggérant que *RSPO1* agirait sur la méiose par une autre voie (cf. chapitre IV-2 p28). Il a été observé chez ces souris *RSPO1*<sup>-/-</sup> une augmentation des jonctions adhérentes entre les cellules germinales (Chassot *et al.*, 2008a) or lors de la méiose les cellules germinales des gonades XX présentent une diminution de ces jonctions (Di Carlo *et al.*, 2000) suggérant que *RSPO1* interviendrait dans la régulation de ces jonctions adhérentes lors de l'entrée en méiose.

Une autre voie d'action de *RSPO1* est l'activation de l'expression de *WNT4* comme le suggère la diminution des niveaux d'expression de ce gène suite à l'invalidation de *RSPO1* (Chassot *et al.*, 2008b). La voie des WNT comme *RSPO1* utilise les récepteurs FZD/LRP (He *et al.*, 2004). Cependant, si *RSPO1* active la transcription de ce gène, il a des effets propres puisque les phénotypes observés lors de l'invalidation de *RSPO1* sont plus sévères que ceux observés lors de l'invalidation de *WNT4* (Chassot *et al.*, 2008a).

Cette expression plus importante dans l'ovaire reflète un mécanisme conservé au cours de l'évolution et ceux quelque soit le type de déterminisme du sexe. En effet, *RSPO1* est plus exprimé dans l'ovaire chez le poisson-zèbre (Zhang *et al.*, 2010); chez la tortue *trachemys scripta* (*RSPO1* augmentant aux températures promouvant le développement femelle); chez le poulet (Smith *et al.*, 2008b) ou encore chez la chèvre (Kocer *et al.*, 2008).

Ainsi, chez le poulet, ce gène est surexprimé dans la gonade femelle très précocement dès le jour 4.5 et ce dimorphisme sexuel d'expression devient très important au jour 8.5. Cette protéine a une localisation dans la région corticale qui est le siège du développement des cellules somatiques pré-folliculaires et des cellules germinales (Smith *et al.*, 2008b) suggérant que chez le poulet RSPO1 pourrait être impliqué dans la régulation des méioses.

De plus, après l'injection d'un inhibiteur de l'aromatase au jour 3, on observe une diminution de l'expression de *RSPO1* supposant une régulation de ce gène par les œstrogènes. Cependant cette absence d'expression de RSPO1 peut également être la conséquence de l'absence de développement de la région corticale suite à l'absence d'œstrogènes (Smith *et al.*, 2008b). Il est intéressant de noter qu'il y a une absence d'expression de *RSPO1* dans les gonades droites qui régressent.

#### *f- WNT4*

*WNT4* (Wingless-type MMTV integration site family) est une protéine de signalisation qui est impliquée chez les mammifères dans la mise en place du système rénal et des gonades (Bernard *et al.*, 2007). En effet, l'inactivation de ce gène chez la souris entraîne la mort peu après la naissance suite à une insuffisance rénale (Stark *et al.*, 1994), qui est liée à un défaut dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules épithéliales, étape indispensable à la formation des tubules rénaux (Kispert *et al.*, 1998). D'autre part, l'inactivation de ce gène chez les souris XX, entraîne la masculinisation des gonades (vascularisation caractéristique du développement testiculaire, sécrétion de testostérone, perte des ovocytes) s'accompagnant d'un développement du canal de Wolf et une absence des canaux de Müller (Vainio *et al.*, 1999; Jeays-Ward *et al.*, 2003; Heikkila *et al.*, 2005). Comme mentionné précédemment, l'expression de *WNT4* est régulée par RSPO1 (Chassot *et al.*, 2008a; Tomizuka *et al.*, 2008) dans les gonades XX tandis que SOX9 inhibe cette expression dans les gonades XY (Qin *et al.*, 2005).

Chez le poulet, *WNT4* est exprimé au jour 4 d'incubation dans le mésonéphros des deux sexes sans dimorphisme apparent (Oreal *et al.*, 2002) puis au jour 6.5, l'expression est retrouvée dans les gonades avec des niveaux similaires entre les deux sexes (Smith *et al.*, 2008b). A partir du jour 8.5, cette expression diminue dans le testicule alors qu'elle se maintient dans l'ovaire en différenciation (Smith *et al.*, 2008b). D'autre part, au jour 7 post-éclosion, l'expression de *WNT4* est retrouvée dans les cellules folliculaires ovariennes ainsi que dans certains ovocytes (Oreal *et al.*, 2002).

Ainsi, chez le poulet, *WNT4* est comme chez les mammifères plus exprimé dans l'ovaire en différenciation; néanmoins sa fonction différerait de celle observée chez les mammifères puisque chez le poulet, il n'y a pas de mise en place d'une vascularisation mâle-spécifique.

Contrairement au testicule, l'ovaire embryonnaire de poulet ne présente pas d'organisation cellulaire particulière, notamment car la mise en place des follicules primordiaux n'a lieu qu'après l'éclosion. Cependant, comme chez les mammifères, les cellules germinales débutent leur méiose pendant la vie embryonnaire. Si les gènes impliqués dans la mise en place de l'ovaire des mammifères semblent également jouer un rôle dans la différenciation de la gonade femelle chez les poulets, de nombreuses questions restent à élucider sur la cascade des gènes responsables de la différenciation ovarienne et notamment le ou les gènes impliqués dans la régulation de l'expression de *FOXL2* et de *CYP19A1*. D'autre part, la différenciation ovarienne chez le poulet présente des particularités fondamentales comme le développement asymétrique de la gonade gauche et une grande sensibilité aux stéroïdes; points qui seront développés dans le chapitre suivant.

## V- Les particularités du modèle poulet

### 1- L'asymétrie ovarienne

Contrairement aux mammifères où le développement des gonades est bilatéral, chez le poulet le développement de l'ovaire est asymétrique. Le développement asymétrique des gonades est également observé chez certaines espèces de vertébrés inférieurs comme certains coléoptères, nématodes ou crustacés (Rebecchi *et al.*, 2000; Siddall, 2004; Will *et al.*, 2005). Ces espèces présentent une monorchidie avec le développement d'un seul testicule. De manière similaire aux mammifères, chez les oiseaux, les gonades des individus mâles (ZZ) se développent bilatéralement pour donner deux testicules. A l'inverse, chez la femelle (ZW) seul le cortex de la gonade gauche se développe afin de former un ovaire fonctionnel. De même, seul le canal de Müller gauche se développe pour donner l'oviducte alors que le droit régresse ne subsistant que dans sa partie postérieure.

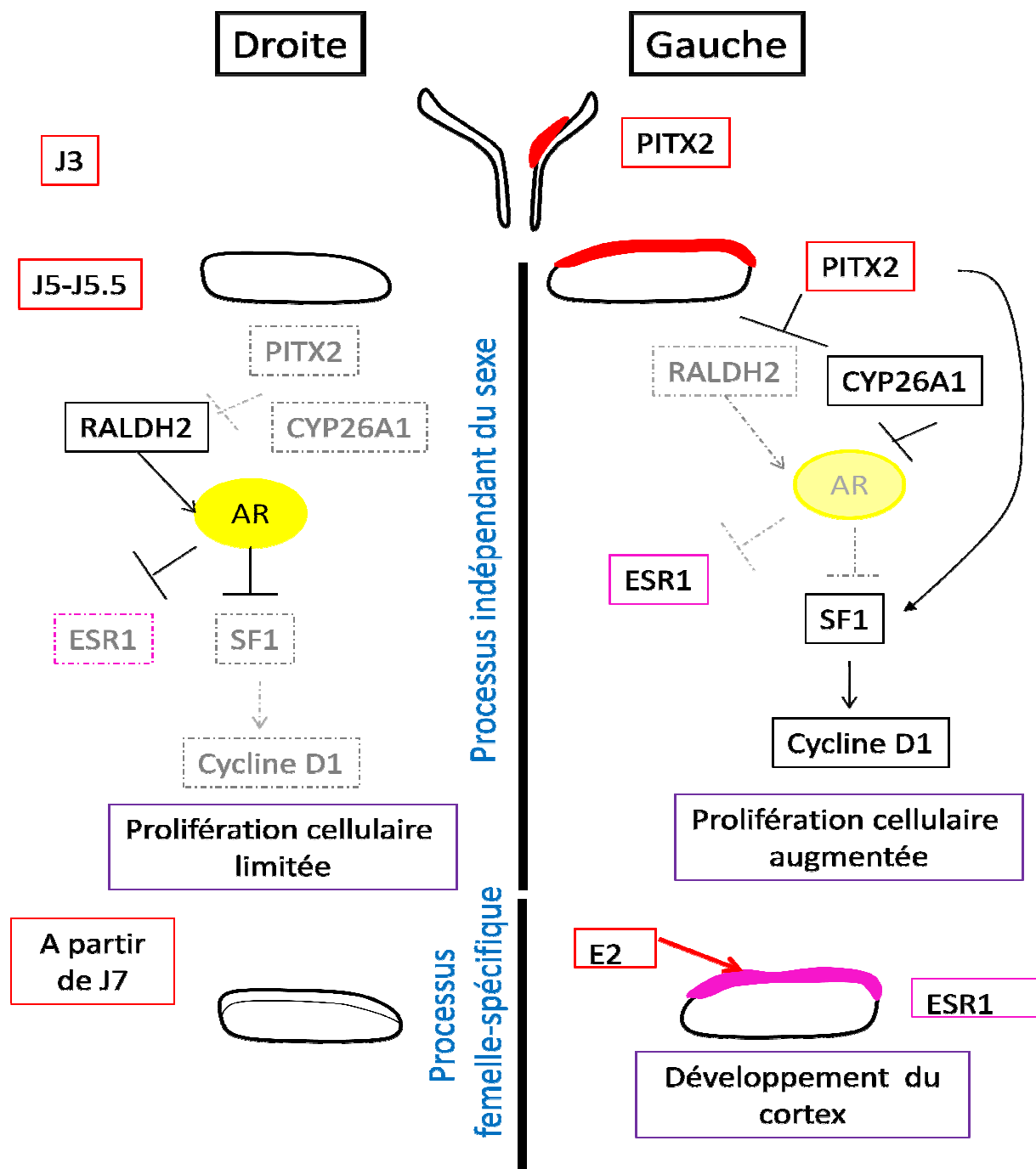


Figure 9 : La mise en place de l'asymétrie d'après (Ishimaru et al., 2008).

PITX2 est exprimé par le cortex gauche des gonades des deux sexes. L'expression de ce gène entraîne la diminution de la synthèse de l'acide rétinolique (AR) grâce à l'expression de l'enzyme de dégradation qu'est CYP26A1 et à la diminution de l'expression de l'enzyme de synthèse qu'est RALDH2. L'absence d'acide rétinolique permet la stimulation de la prolifération cellulaire du cortex via l'action de SF1 et de la cycline D1. La deuxième phase du processus est spécifique de la femelle où l'œstradiol (E2) va stimuler la prolifération du cortex via son récepteur (ESR1) qui n'est exprimé que par le cortex gauche.



Au cours du développement embryonnaire, l'ovaire droit commence à croître et atteint sa taille maximale entre les jours 10 et 12 d'incubation (Teng *et al.*, 1977). Mais sans développement de la partie corticale, cet ovaire droit va régresser pour ne laisser, *in fine*, qu'un tissu rudimentaire qui n'est quasiment plus visible après 70 jours de vie post-éclosion.

Dans l'établissement de l'asymétrie, il faut distinguer deux phases: la première étant indépendante du sexe génétique et se met en place avant le début de la différenciation histologique de la gonade tandis que la deuxième phase est spécifique du sexe et ne concerne que les femelles.

Dans la première phase d'établissement de l'asymétrie, au jour 6.5, au moment du début de la différenciation histologique de la gonade, le nombre de cellules somatiques du cortex gauche est multiplié par 2 tandis que le nombre de cellules du cortex droit n'est pas modifié (Ishimaru *et al.*, 2008). Dans le même temps, le nombre de cellules de la médulla est multiplié par 4 et ce aussi bien à gauche qu'à droite. Il est à noter que cette asymétrie dans la prolifération cellulaire est alors observée dans les gonades mâles comme dans les gonades femelles.

Il a été récemment montré que *PITX2*, un membre de la famille de gènes à homéoboite de type bicoïd (Gage *et al.*, 1999), a une expression plus importante dans le cortex gauche des gonades mâles et femelles (Guioli *et al.*, 2007; Ishimaru *et al.*, 2008) (Figure 9). Ce gène est impliqué dans le développement du cortex gauche puisque sa surexpression dans la gonade droite entraîne le développement du cortex (Guioli *et al.*, 2007; Ishimaru *et al.*, 2008). D'autre part, il a été montré que *PITX2* entraînait la diminution de l'expression de *RALDH2* (l'enzyme de synthèse de l'acide rétinoïque) qui est physiologiquement plus exprimé dans la gonade droite par rapport à la gonade gauche. De même, *CYP26A1*, (enzyme de dégradation de l'acide rétinoïque) est plus exprimé dans le cortex gauche. Ainsi, il y aurait une production d'acide rétinoïque plus importante par le cortex droit que par le cortex gauche où elle serait limitée par l'expression de *PITX2*. L'acide rétinoïque produit dans le cortex droit limiterait l'expression de *SFI* qui serait stimulateur de l'expression de la cycline D1, facteur qui régule le cycle cellulaire et qui est impliqué dans la prolifération cellulaire. Dans le cortex gauche, en absence de l'acide rétinoïque, *PITX2* entraîne l'expression de *SFI* et donc la prolifération cellulaire (Ishimaru *et al.*, 2008).

De plus, chez la souris, il a été montré que *PITX2* pouvait directement activer l'expression de *SFI* (Kioussi *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2004); dès lors *PITX2* pourrait

également activer la transcription de *SFI* de manière directe dans le cortex gauche (Ishimaru *et al.*, 2008).

La deuxième phase d'établissement de l'asymétrie implique les œstrogènes produits par les gonades femelles. En effet, le récepteur alpha aux œstrogènes (*ESR1*) est exprimé par le cortex gauche des deux sexes (Andrews *et al.*, 1997) (Smith *et al.*, 1997; Guioli *et al.*, 2007). L'expression de *ESR1* dans les cortex droits est inhibée par l'acide rétinoïque tandis qu'à gauche, en absence d'acide rétinoïque, le récepteur est exprimé. Les œstrogènes produits par la gonade femelle vont stimuler la prolifération du cortex via ce récepteur. Dans la gonade droite, en absence de récepteur et malgré le fait qu'elle exprime également l'aromatase et produit donc des œstrogènes (Villalpando *et al.*, 2000; Vaillant *et al.*, 2003), ces derniers ne pourront agir et le cortex ne va pas proliférer.

D'autre part, le récepteur aux œstrogènes est plus exprimé dans le canal de Müller gauche que dans la canal de Muller droit (Maclaughlin *et al.*, 1983). Ainsi, les œstrogènes protégeraient de l'action de l'AMH sur le canal de Muller gauche qui se maintient tandis que la sensibilité moindre aux œstrogènes du canal droit ne protège pas de l'action de l'AMH et va régresser (Hutson *et al.*, 1982; Newbold *et al.*, 1984; Doi *et al.*, 1988).

Chez le mâle, en absence d'œstrogènes, le cortex gauche n'est pas stimulé et les deux cortex demeureront rudimentaires expliquant que malgré l'expression asymétrique des gènes de façon similaire à celle de la femelle, l'asymétrie reste silencieuse et les gonades se développent bilatéralement.

D'autres gènes présentent une expression asymétrique dans les gonades au cours du développement embryonnaire mais leurs implications dans l'établissement de l'asymétrie restent inconnues. Ainsi, *OVEX1*, un rétrovirus endogène, est exprimé dans le cortex des gonades gauches au stade indifférencié (jour 5) et cela dans les deux sexes. Après le début de la différenciation gonadique (jour 6), l'expression est plus importante dans la gonade femelle que dans la gonade mâle. Et cette expression est plus importante dans la gonade femelle gauche que dans la gonade droite. De plus, l'expression chez le mâle est transitoire, car elle est présente au jour 8 mais a disparue au jour 12 (Carre-Eusebe *et al.*, 2009).

*BMP7* (Bone Morphogenetic Protein) présente également un profil d'expression différent entre les gonades gauches et droites. *BMP7* est exprimé très précocement dans la région présomptive de la gonade au jour 4.5 et avec une expression faible qui n'est visible que

du coté gauche. Au cours du développement gonadique (J8), l'expression de *BMP7* n'est plus détectée dans la gonade mâle et n'est détectée que dans la médulla de la gonade gauche femelle (Hoshino *et al.*, 2005).

## 2- La sensibilité aux stéroïdes

### a- La production de stéroïdes

Le développement gonadique chez les vertébrés inférieurs est influençable par les stéroïdes. Cette sensibilité n'est pas observée chez les mammifères euthériens où le développement embryonnaire se déroule au sein de l'utérus qui est baigné par les hormones maternelles.

La souris est un cas particulier car les ovaires embryonnaires ne présentent pas de stéroïdogénèse active. Néanmoins, l'inactivation des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  (ERKO) (Couse *et al.*, 1999; Dupont *et al.*, 2000) ou du gène codant pour l'aromatase (ARKO) (Britt *et al.*, 2001) entraîne, 6 semaines après la naissance, la différenciation de tubes séminifères, de cellules de Sertoli et de cellules de Leydig chez les individus XX (Britt *et al.*, 2003). Ainsi les œstrogènes interviendrait dans la maintien à l'état différencié des cellules somatiques de l'ovaire.

Chez les autres mammifères euthériens, la production des stéroïdes et en particulier des œstrogènes a lieu dans l'ovaire embryonnaire et débute entre le moment du début de la différenciation ovarienne et le moment des premières divisions méiotiques (Mauleon *et al.*, 1977; Payen *et al.*, 1996; Quirke *et al.*, 2001). De même chez le poulet la production de stéroïdes est fondamentale pour la différenciation de l'ovaire.

La production de stéroïdes par la gonade embryonnaire de poulet est très précoce et est déjà présente au début de la différenciation histologique de la gonade (J6-6.5). Les gonades des deux sexes produisent de la progestérone (P4) et de la testostérone (T4) (Galli *et al.*, 1972; Galli *et al.*, 1973; Guichard *et al.*, 1973; Guichard *et al.*, 1977a; Guichard *et al.*, 1977b; Guichard *et al.*, 1979) tandis que la production d'œstradiol (E2) n'est réalisée que par la gonade femelle (Weniger *et al.*, 1971).

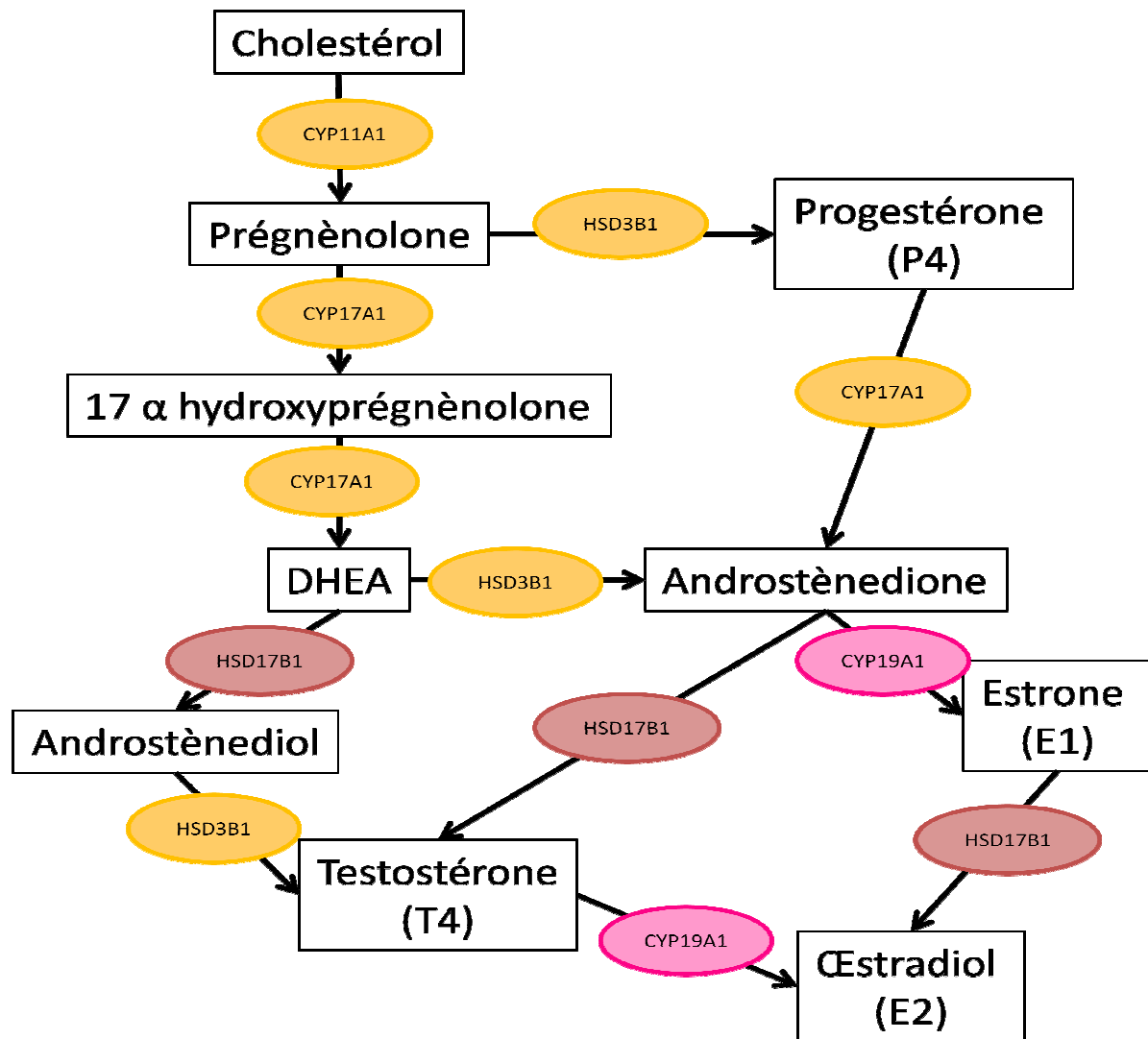


Figure 10 : Les voies de synthèse des stéroïdes (d'après Bruggeman et al., 2002).

La conversion du cholestérol en stéroïdes implique plusieurs enzymes. La première étape implique la P450 side-chain cleavage codée par le gène *CYP11A1* et qui permet la synthèse de prégnénolone. L'action de la 3 $\beta$ -stéroïde-déshydrogénase codée par le gène *HSD3B1* permet la synthèse de progéstérone (P4) à partir de la prégnénolone. La synthèse des androgènes et en particulier de la testostérone (T4) implique un cytochrome codé par *CYP17A1* qu'est la 17 $\beta\alpha$ -hydroxylase/17-20-lyase ainsi que la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde oxydoréductase codée par le gène *HSD17B1*. Enfin, la synthèse des œstrogènes (œstrone (E1) et œstradiol (E2)) à partir des androgènes implique l'aromatase qui est codée par le gène *CYP19A1*. Les enzymes encadrées de jaunes sont exprimés dans les gonades des deux sexes, les enzymes encadrées de marron sont exprimés dans la gonade femelle au début de la différenciation gonadique tandis qu'elles sont exprimés dans les gonades des deux sexes par la suite et les enzymes encadrées de rose sont exprimés uniquement par la gonade femelle.

La production des stéroïdes augmente au cours du développement embryonnaire dans les deux sexes mais les niveaux restent plus élevés dans l'ovaire (Guichard *et al.*, 1977a) et sont mesurés dans le plasma dès le jour 7.5 (Woods *et al.*, 1981; Woods *et al.*, 1982; Tanabe *et al.*, 1986).

La production précoce des stéroïdes est la conséquence de l'expression dès le jour 4 des gènes codant pour les enzymes de conversion du cholestérol en androgènes (*CYP11A1*, *HSD3B1* et *CYP17A1*) dans les gonades mâles et femelles (Akazome *et al.*, 2002) (Figure 10); expression qui augmente progressivement au cours du développement et de façon plus importante dans la gonade femelle après les jours 6-6.5 (Yoshida *et al.*, 1996; Nakabayashi *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 1999; Kamata *et al.*, 2004). La production d'œstradiol est spécifique de la gonade femelle (Gasc, 1980) puisque seule la gonade femelle exprime les enzymes nécessaires à la conversion de l'androsténédione en œstradiol que sont *HSD17B1* et *CYP19A1* (Yoshida *et al.*, 1996; Andrews *et al.*, 1997; Nakabayashi *et al.*, 1998; Nishikimi *et al.*, 2000; Akazome *et al.*, 2002). L'ARNm de *CYP19A1* ainsi que l'activité de cette enzyme sont détectés dans la médulla de l'ovaire gauche et droit aux jours 5-6. Il est dès lors supposé que cette activation d'expression serait liée à un ou des gènes portés par le chromosome W (Villalpando *et al.*, 2000).

Si la production d'œstradiol est spécifique aux gonades femelles, l'expression du récepteur  $\alpha$  des œstrogènes (*ESR1*) est détectée par *hybridation-in-situ* à des niveaux similaires dans les gonades bipotentiels droites et gauches des deux sexes dès le jour 4.5 (Andrews *et al.*, 1997). Cette expression persiste après le début de la différenciation histologique avec une expression plus importante dans le cortex gauche que dans le cortex droit (Andrews *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Nakabayashi *et al.*, 1998; Guioli *et al.*, 2007). Cette expression détectée par RT-PCR au jour 6 dans la gonade des deux sexes va augmenter au cours du développement de l'ovaire gauche (expression non détectable dans l'ovaire droit) tandis que chez le mâle l'expression est transitoire et est détectée entre les jours 7 et 10 et n'est plus détectée après le jour 12 (Nakabayashi *et al.*, 1998). Dès lors, les œstrogènes vont stimuler la prolifération du cortex gauche de la gonade femelle. D'autre part, les œstrogènes sont impliqués également dans le développement des caractères sexuels secondaires, dans le développement sexuel du système nerveux ainsi que dans le développement du syrinx (organe vocal) (van Tienhoven, 1983; Norris, 1985).

### ***b- La régulation par les hormones gonadotropes***

Chez les mammifères comme chez la poule adulte, la régulation de la stéroïdogénèse par les hormones gonadotropes est très documentée et de façon similaire, ces hormones gonadotropes sont impliquées dans la régulation de la production des stéroïdes par les gonades embryonnaires.

Les hormones gonadotropes, la LH (Luteinising Hormone) et la FSH (Follicle Stimulating Hormone) sont des hormones glycoprotéiques synthétisées par l'hypophyse et qui sont composées de l'association d'une sous-unité  $\alpha$  commune (Tager *et al.*, 1974) avec une sous-unité  $\beta$  spécifique (Pierce *et al.*, 1981).

Dans l'embryon de poulet, les ARNm codant pour la sous-unité  $\beta$  de la LH (Noce *et al.*, 1989; You *et al.*, 1995) sont détectés dès le jour 4 et les ARNm codant pour la sous-unité  $\beta$  de la FSH (Shen *et al.*, 2002) sont détectés à partir du jour 7. Ces données suggèrent que l'embryon de poulet est susceptible de synthétiser des hormones gonadotropes de façon précoce. Néanmoins, les études immuno-histologiques montrent que les premières cellules gonadotropes produisant la protéine LH ou la protéine FSH apparaissent au niveau de la région ventro-médiale du lobe caudal de l'adénohypophyse aux jour 9 et 13 respectivement (Puebla-Osorio *et al.*, 2002; Maseki *et al.*, 2004; Grzegorzewska *et al.*, 2009).

Outre ce délai dans l'apparition de la FSH par rapport à la LH, il apparaît que les cellules exprimant l'une ou l'autre de ces hormones gonadotropes sont des populations distinctes au cours du développement embryonnaire (Puebla-Osorio *et al.*, 2002) comme elles le sont au moment de l'éclosion et à l'âge adulte (Proudman *et al.*, 1999).

Néanmoins, la LH est détectée dans le plasma des embryons aux jours 10 et 12 suggérant qu'à ce stade la synthèse des hormones gonadotropes est effective (Tanabe *et al.*, 1986; Woods, 1987) et les niveaux vont progressivement augmenter pour atteindre un plateau maximal au jour 19.5 (Gonzalez *et al.*, 1987). De même, la FSH est détectable dans le plasma des embryons de poulets des deux sexes dès le jour 8 (Rombauts *et al.*, 1993). Il existe cependant un dimorphisme sexuel dans les profils de sécrétions entre la femelle et le mâle.

Dans les embryons femelles, les niveaux augmentent modérément au jour 10 avant de diminuer à nouveau et de se maintenir à des niveaux relativement faible pendant tout le développement ; tandis que chez le mâle, les niveaux augmentent à partir du jour 10 pour atteindre un niveau maximum au jour 13 et vont ensuite diminuer mais tout en restant tout au

long du développement embryonnaire à un niveau 2 à 5 fois plus élevés que chez la femelle (Rombauts *et al.*, 1993) cohérent avec une expression plus importante de la sous-unité  $\beta$  de la FSH chez le mâle (Grzegorzewska *et al.*, 2009).

D'autre part, les gonades embryonnaires de poulets sont sensibles aux hormones gonadotropes comme le montre la liaison de FSH radio-marquée sur l'ovaire dès le jour 6 (Woods *et al.*, 1991) ; liaison qui est médullaire jusqu'au jour 19.5 puis qui devient corticale (Woods *et al.*, 1991).

Cette capacité de répondre aux hormones gonadotropes est confirmée par la détection des ARNm codant pour le récepteur à la LH (LHR) (Johnson *et al.*, 1996a; Mizutani *et al.*, 1998) et pour FSHR (You *et al.*, 1996; Wakabayashi *et al.*, 1997) dans l'embryon de poulet dès le jour 4 (Akazome *et al.*, 2002). Chez la femelle, l'expression de ces récepteurs augmentent entre les jours 4 et 6 puis au jour 12 tandis que dans la gonade mâle, cette expression se maintient à un niveau faible jusqu'au jour 6. Par la suite l'expression de ces récepteur augmente dans les gonades des deux sexes mais avec une augmentation des niveaux plus importante dans la gonade femelle (Akazome *et al.*, 2002).

De plus, il existe une corrélation positive entre les niveaux d'expression de la sous-unité  $\beta$  de la FSH dans l'adénohypophyse femelle et les niveaux d'expression de FSHR dans l'ovaire tandis qu'il existe une corrélation positive entre les niveaux d'expression de la sous-unité  $\beta$  de la LH dans l'adénohypophyse mâle et les niveaux d'expression de LHR dans le testicule; suggérant une régulation positive par les hormones gonadotropes de leurs récepteurs (Grzegorzewska *et al.*, 2009). Cette hypothèse est renforcé par la diminution de l'expression de ces deux récepteurs après une adénohypophysectomie (Sanchez-Bringas *et al.*, 2006).

Au cours du développement embryonnaire, l'adjonction des hormones gonadotropes modifie la production de stéroïdes ainsi que les niveaux de prolifération cellulaire.

En effet, le traitement des embryons de poulet femelles avec de la LH équine au jour 7.5 (Woods, 1987) ou hCG (Human Chorion Gonadotropine) au jour 8 (Teng *et al.*, 1977) entraîne une augmentation de la production d'œstradiol. L'hCG qui est considérée simuler une action de la LH n'a pas d'effet sur l'activité de la HSD3B1 ou de l'aromatase mais stimulerait l'activité de CYP11A1 dans les cellules dissociées d'ovaires embryonnaires de jour 18 (Gomez *et al.*, 2001).

L'adjonction *in vivo* ou *in vitro* de FSH entraîne une augmentation de la production d'œstradiol par l'ovaire embryonnaire aux jours 8, 10, 13, 15 et 18 (Teng *et al.*, 1982; Velazquez *et al.*, 1997; Pedernera *et al.*, 1999) avec un maximum d'effet au jour 8 (Pedernera *et al.*, 1999). De plus, lors d'adénohypophysectomie, la production d'œstradiol est réduite comme le montre les mesures aux jours 10, 11 et 13 (Weniger *et al.*, 1990) et est rétablie après l'ajout de FSH sur des cultures de cellules ovariennes issues de poulets adénohypophysectomisés (Sanchez-Bringas *et al.*, 2006) confirmant que les hormones gonadotropes influent sur la production d'œstradiol par l'ovaire. L'ajout de FSH sur des cultures de cellules dissociées d'ovaires au jour 18 montre une augmentation de l'activité de l'enzyme codée par le gène *HSD3B1*, une augmentation de l'activité de l'enzyme ainsi que l'expression du gène *CYP11A1* qui la code et une augmentation transcriptionnelle et traductionnelle de l'aromatase (Gomez *et al.*, 2001). D'autre part, après une adénohypophysectomie, il existe une diminution de l'activité de l'enzyme HSD3B1 au jour 13.5 (Woods *et al.*, 1969) confirmant l'action des hormones gonadotropes sur l'activité de cette enzyme.

La FSH augmente également la production de testostérone aux jours 8, 10, 13,15 et 18 par les cellules ovariennes et uniquement aux jours 8, 15 et 18 par les cellules du testicule (Teng *et al.*, 1982; Pedernera *et al.*, 1999; Peralta *et al.*, 2004).

Bien que la FSH semble réguler positivement la production de stéroïdes, lors d'hypophysectomie, les ovaires sécrètent de l'œstradiol jusqu'au jour 14-16, laissant penser que la production d'œstradiol peut se réaliser indépendamment des hormones gonadotropes (Weniger *et al.*, 1987; Weniger *et al.*, 1989a, b).

Outre les effets sur la stéroïdogénèse, les hormones gonadotropes influencent également les niveaux de prolifération cellulaire. Ainsi l'ajout de FSH aux cultures de cellules ovariennes augmente la prolifération aux jours 13, 14, 15 et 18 ; phénomène qui n'est pas observé aux jours 8 et 10 (Velazquez *et al.*, 1997; Mendez-Herrera *et al.*, 1998; Pedernera *et al.*, 1999). Ces effets sont également observés dans les cultures de cellules testiculaires à tous les stades étudiés (8, 10, 13, 15, 18) (Velazquez *et al.*, 1997; Pedernera *et al.*, 1999; Peralta *et al.*, 2004).

Ces données sont renforcées par le fait qu'après une adénohypophysectomie, le nombre de cellules ovariennes est diminué aux jours 9, 13 et 14 (Mendez *et al.*, 2005; Sanchez-Bringas *et al.*, 2006). Et lorsque ces individus sont traités avec de la FSH, le nombre



de cellules est rétabli ; inversant ainsi les effets de l'adénohypophysectomie (Sanchez-Bringas *et al.*, 2006). A l'inverse, le traitement avec hCG ne rétablit pas les niveaux de prolifération cellulaire, suggérant que la diminution de la prolifération cellulaire suite à l'adénohypophysectomie est due à la privation en FSH et non en LH. Et en effet, l'ajout de hCG sur des cultures de cellules dissociées d'ovaire au jour 17 et 18, n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules stéroïdogènes dans l'ovaire au jour 17 et 18 (Velazquez *et al.*, 1997; Mendez-Herrera *et al.*, 1998).

La protéine kinase A (PKA) et l'AMPc sont impliqués dans la voie de signalisation de la FSH chez les mammifères (Chun *et al.*, 1996; Johnson, 2003). De plus dans les cellules de granulosa de poule, la survie cellulaire est augmentée avec le 8-bromo-cAMP (Johnson *et al.*, 1996b). Cependant, dans les cultures de cellules dissociées de testicule de poulet au jour 18, l'ajout de forskolin (agoniste de la voie PKA) ou d'AMPc n'augmente pas la prolifération cellulaire, suggérant que les effets de la FSH ne sont pas dus à une activation de la voie PKA-AMPc (Peralta *et al.*, 2009). De même, La voie de la protéine kinase C (PKC) est impliquée dans la signalisation de la FSH dans les cellules de granulosa des mammifères (Peluso *et al.*, 1993) mais l'ajout d'un activateur de cette voie (Le phorbol myristate (PMA)), ne modifie pas les niveaux de prolifération dans les cellules dissociées de testicule de poulet au jour 18 suggérant que les effets de la FSH n'active pas non plus la voie PKC (Peralta *et al.*, 2009). A l'inverse, l'herbamycine, un bloqueur de la voie de la protéine tyrosine kinase (PKT), réduit les niveaux de prolifération qui ne sont pas rétablie par l'ajout de la FSH, suggérant que la FSH utilise la voie de la PKT pour stimuler la prolifération des cellules testiculaires (Peralta *et al.*, 2009).

Si l'œstradiol augmente la prolifération dans l'ovaire des mammifères (Dorrington *et al.*, 1993), il n'a aucun effet sur les niveaux de prolifération des cellules ovariennes de poulet au jour 18 (Velazquez *et al.*, 1997) ni dans le testicule au jour 18 (Peralta *et al.*, 2004) ; les effets de la FSH sur la prolifération des cellules n'est donc pas médié par l'augmentation de la synthèse d'œstradiol. Néanmoins, l'absence d'effet de l'œstradiol sur les gonades mâles n'est pas surprenante car ils n'expriment plus le récepteur à ce stade.

### ***c- Les inversions du sexe***

La sensibilité du développement gonadique aux hormones stéroïdiennes est retrouvée chez de nombreuses espèces de vertébrés inférieurs qu'elles présentent un déterminisme génétique et/ou environnemental (poissons, amphibiens, reptiles et les oiseaux).

Chez de nombreuses espèces de poissons, l'administration orale d'œstrogènes, pendant la période de la différenciation gonadique, entraîne une différenciation ovarienne chez des individus génétiquement mâles tandis que l'ajout d'androgènes entraîne la différenciation testiculaire chez des individus génétiquement femelles (Yamamoto, 1962, 1969; Nakamura *et al.*, 1998). De façon similaire, l'inhibition de l'action de l'aromatase et donc de la production des œstrogènes entraîne le développement partiel ou complet de testicules chez des individus génétiquement femelles (Guiguen *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2000).

Chez les amphibiens, les effets des stéroïdes sont plus contradictoires et vont varier selon les espèces, les stéroïdes et les doses utilisées (Nakamura, 2009).

Chez les reptiles, lors d'incubation des œufs à une température favorisant le développement « mâle », les traitements oestrogéniques induisent la différenciation ovarienne. Cependant, contrairement aux poissons, les androgènes n'induisent pas d'inversion gonadique femelle-mâle. De plus, ces traitements androgéniques, lors d'incubation aux températures « pro-mâle », induisent le développement d'un cortex de type ovarien à la surface du testicule suggérant un rôle des androgènes dans le développement de la gonade femelle (Pieau *et al.*, 2001).

Chez les individus génétiquement mâles, le traitement aux œstrogènes avant le début de la différenciation gonadique induit la régression de la gonade droite et le développement d'un ovaire à gauche.

De nombreuses expériences ont montré que le développement gonadique chez le poulet présentait une certaine plasticité et était sensible aux manipulations par des hormones exogènes. En effet, l'administration *in ovo* d'oestrogènes avant le début de la différenciation gonadique (aux jours 3 ou 4) entraîne chez les individus ZZ, génétiquement mâles, l'inhibition du développement de la gonade droite et le développement d'un ovaire ou d'un ovotestis à gauche (Scheib, 1983). De plus, chez les individus ZW, génétiquement femelles, l'administration avant le début de la différenciation gonadique d'un anti-oestrogène comme le tamoxifène (Scheib, 1983) ou l'inhibition de l'aromatase, entraîne une inversion du sexe gonadique femelle en mâle (Elbrecht *et al.*, 1992; Wartenberg *et al.*, 1992; Abinawanto *et al.*, 1996; Abinawanto, 1997; Etches, 1997; Burke *et al.*, 1999; Vaillant *et al.*, 2001a; Vaillant *et al.*, 2003). Néanmoins, comme chez les reptiles, les androgènes n'induisent pas l'inversion femelle en mâle.

De plus, l'expression plus importante du récepteur aux androgènes (AR) dans les gonades femelles dès le jour 7 (Katoh *et al.*, 2006) et une translocation nucléaire de ce récepteur qui n'est observé que dans les ovaires suggèrent que les androgènes pourraient jouer un rôle dans le développement ovarien. En effet, le traitement des ovaires avec de la flutamine (antagoniste des AR) entraînent une perturbation dans l'organisation du cortex. Cette désorganisation est proche de celle observée en cas d'inhibition de l'aromatase suggérant que les oestrogènes pourraient agir via le récepteur aux androgènes. Néanmoins, chez le poulet, l'oestradiol n'a qu'une faible affinité pour le récepteur aux androgènes (Doesburg *et al.*, 1997) et ces oestrogènes n'induisent pas la translocation nucléaire de ces récepteur dans les cellules COS7 (Jenster *et al.*, 1993). A l'opposé, les androgènes via leurs récepteurs AR pourraient intervenir dans la régulation de la production des oestrogènes comme le suggère l'existence d'éléments de réponses aux AR (ARE) dans le promoteur de *CYP19A1* (Katoh *et al.*, 2006).

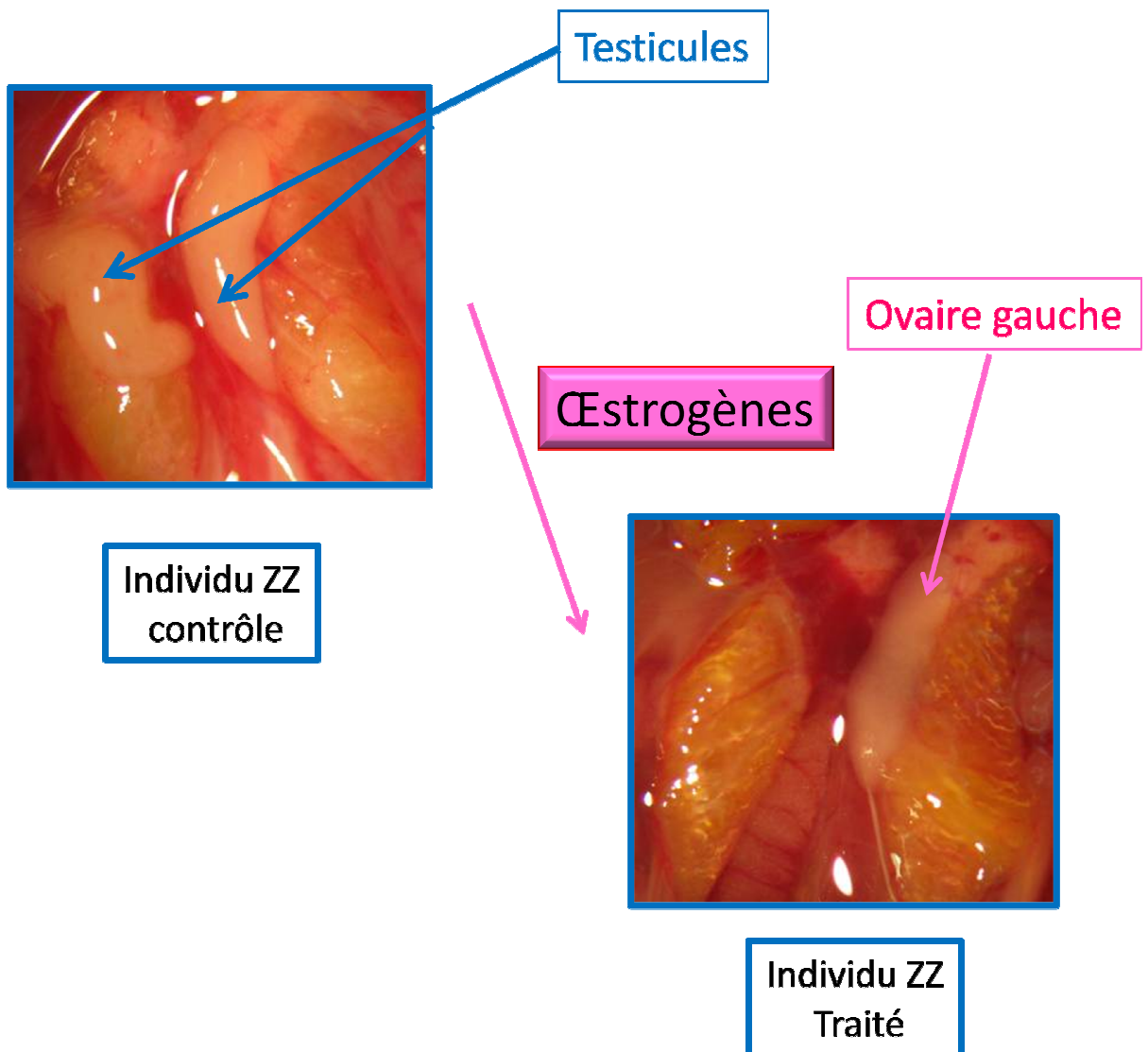


Figure 11 : Inversion du sexe gonadique mâle-femelle suite au traitement par les œstrogènes.

Chez les individus génétiquement mâles, le traitement aux œstrogènes avant le début de la différenciation gonadique induit la régression de la gonade droite et le développement d'un ovaire à gauche.

- L'inversion mâle-femelle

L'administration *in ovo* d'œstradiol avant le début de la différenciation gonadique entraîne une inversion phénotypique de la gonade; ainsi au moment de l'éclosion, tous les mâles génétiques ZZ présentent un phénotype gonadique femelle. Cependant, cette inversion du sexe est transitoire puisqu'à 9 semaines post-éclosion, l'ensemble de ces mâles traités à l'œstradiol présentent à nouveau un phénotype gonadique en accord avec leur sexe génétique (Etches, 1997). Néanmoins, le traitement à l'œstradiol a pour conséquence des perturbations sur la maturation testiculaire avec des anomalies des canaux déférents, une inhibition de la spermatogénèse et des comportements sexuels masculins perturbés (Etches, 1997) (Figure 11).

- L'inversion femelle-mâle

L'inversion du sexe femelle-mâle suite à l'administration d'un inhibiteur de l'aromatase comme le fadrozole présente différents degrés. En effet, à l'éclosion, les individus ZW présentent tous des caractères sexuels externes de type mâle mais le degré d'inversion de leurs systèmes génitaux internes peut varier: Soit deux ovo-testicules avec un oviducte partiel à gauche (Etches, 1997); soit un testicule droit et un ovo-testicule à gauche (Vaillant *et al.*, 2003) avec un oviducte développé à gauche; soit deux testicules et un oviducte développé à gauche (Abinawanto *et al.*, 1996; Abinawanto, 1997; Vaillant *et al.*, 2003); soit deux testicules et pas d'oviducte (Elbrecht *et al.*, 1992) (Figure 12).

Le degré d'inversion est reflété par le taux de production d'œstradiol et les niveaux d'activité de l'aromatase. En effet, plus la production d'œstradiol est faible, plus l'inversion gonadique est complète car si les niveaux d'activité de l'aromatase sont plus faibles que ceux observés dans les femelles contrôles, ils restent cependant plus élevés que chez les mâles ZZ contrôles (Vaillant *et al.*, 2003). Dès lors les niveaux des œstrogènes peuvent être suffisants pour empêcher l'action de l'AMH sur les canaux de Müller (Hutson *et al.*, 1982) et expliquer ainsi le développement même partiel d'un oviducte (Vaillant *et al.*, 2003). L'inhibition de l'aromatase chez les femelles ZW entraîne une absence de développement totale ou partielle du cortex gauche qui est une caractéristique du développement ovarien et ces gonades sont entourées comme les testicules d'une albuginée. De plus, à l'intérieur de la médulla, certaines des lacunes ovariennes acquièrent les caractéristiques des cordons testiculaires avec un épithélium épais et renferment des cellules germinales.

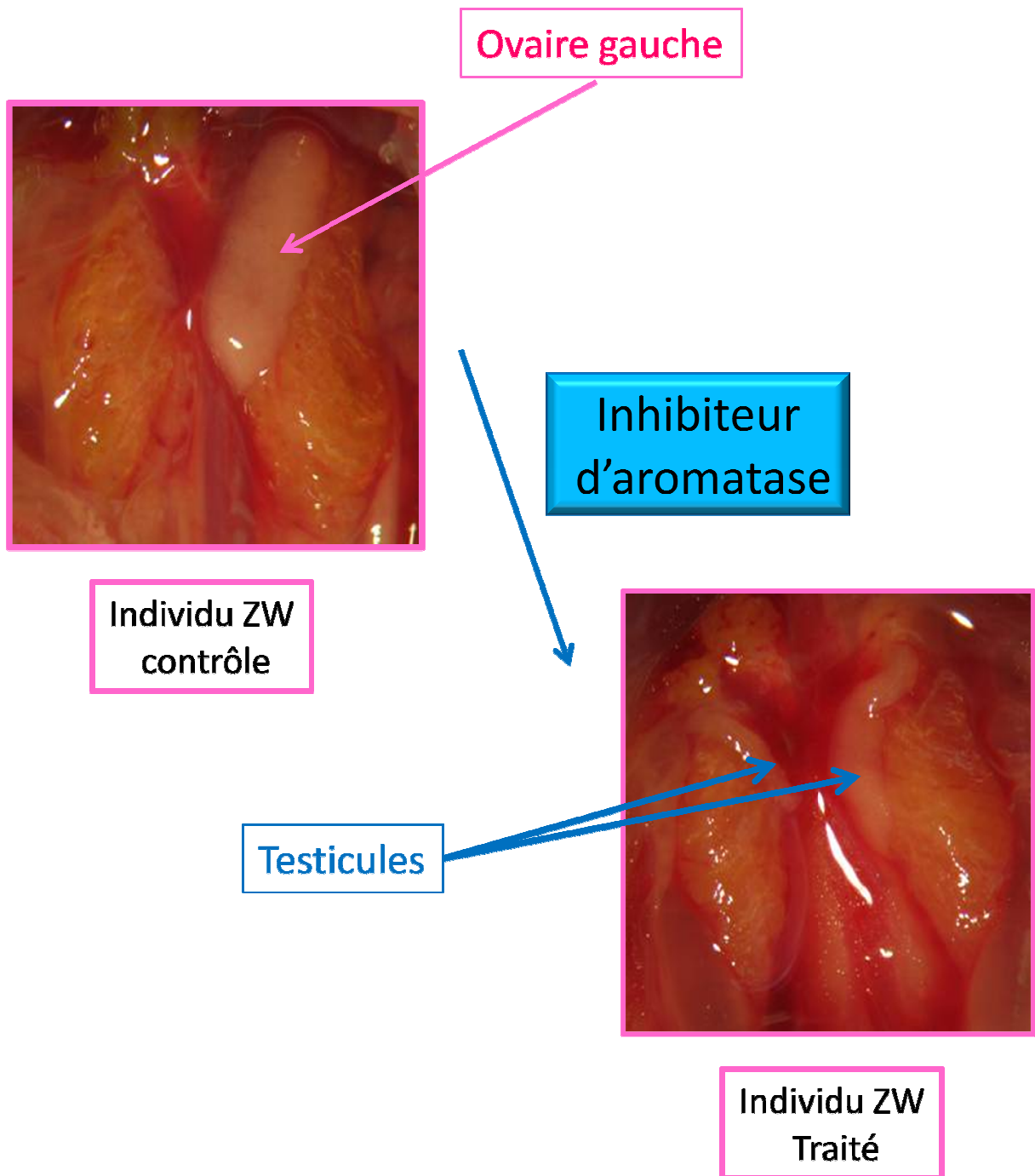


Figure 12 : Inversion du sexe gonadique femelle-mâle par un inhibiteur d'aromatase.

Chez les individus génétiquement femelles ZW, l'inhibition de l'aromatase avant le début de la différenciation gonadique, abolissant la production d'œstrogènes, induit la différenciation de deux gonades mâles.

Néanmoins, il est observé des lacunes composites qui possèdent les deux phénotypes avec un épithélium épais proche des cordons testiculaires, exprimant les facteurs des cellules de Sertoli (AMH, SOX9 et SF1) et un épithélium mince dont les cellules n'expriment pas ces facteurs (Vaillant *et al.*, 2001b). Ces données suggèrent la possibilité d'une transdifférenciation des cellules épithéliales ovariennes en cellules de Sertoli. L'analyse des ovo-testicules post-éclosion montre que les régions ovariennes possèdent des follicules corticaux en croissance. Dans les testicules ou les régions testiculaires des femelles inversées, la spermatogénèse peut se dérouler mais il existe des défauts de spermiogénèse puisqu'il est observé dans la lumière des tubes séminifères de nombreuses spermatides rondes liées à l'épithélium de ces tubes (Elbrecht *et al.*, 1992; Abinawanto, 1997; Vaillant *et al.*, 2003). Il est cependant possible d'observer des spermatides allongées dans les tubes séminifères. Dans les cas d'inversion avec deux testicules, il est possible de prélever manuellement des éjaculats qui présentent un faible taux de spermatozoïdes qui de surcroît présentent un fort taux d'anomalies de la tête et une très faible mobilité (Vaillant *et al.*, 2003). Dès lors l'incapacité de féconder des poules ZW avec des femelles inversées proviendrait plus d'un défaut de la spermiogénèse que d'une anomalie de développement des canaux efférents, des épидидymes ou des canaux déférents (Vaillant *et al.*, 2003).

D'autre part, lors d'expériences d'ovariectomie gauche ou lors de perte de l'ovaire gauche suite à des pathologies, la gonade droite qui a régressé va se développer et former un testicule. Ainsi, la gonade droite garde son potentiel de développement (Kagami *et al.*, 1997a). Ces effets pourraient être dus à la perte des œstrogènes produit par l'ovaire gauche. Cependant, cet effet semble indirect puisque si la castration s'accompagne d'une hypophysectomie, il n'y a pas de développement testiculaire (Kagami *et al.*, 1997a).

Il existe également des inversions du sexe femelle en mâle suite à la greffe d'un testicule embryonnaire dans la cavité coelomique d'un individu ZW avant le début de la différenciation histologique de la gonade (Rashedi *et al.*, 1983; Maraud *et al.*, 1990). Et contrairement aux inversions induites par l'inhibition de l'aromatase, il y a le développement des deux testicules à droite comme à gauche. Il est supposé que cette inversion serait due à la sécrétion d'AMH par les greffons qui joue donc un fort rôle masculinisant.

## Situation du travail

L'étude du développement gonadique en utilisant le poulet comme modèle présente plusieurs intérêts d'un point de vue agronomique comme fondamental. En effet, dans le cadre de la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des gonades, le poulet présente un accès facile et peu onéreux aux embryons permettant de réaliser aisément et avec de nombreuses répétitions les expériences. De plus, le génome du poulet est entièrement séquencé donnant accès aux séquences de tous les gènes, ce qui n'est pas encore établi pour toutes les espèces à intérêt agronomique. D'autre part, comme développé dans la synthèse bibliographique, le développement gonadique du poulet présente des particularités comme l'asymétrie ovarienne ou la sensibilité aux stéroïdes. Ainsi le fait que seule la gonade gauche devienne un ovaire fonctionnel tandis que la gonade droite régresse peut favoriser l'identification de facteurs ovariens en comparant les profils d'expression des deux gonades.

D'autre part, la sensibilité du développement gonadique aux hormones stéroïdiennes sans inversion complète et fonctionnelle du sexe confère au poulet une place particulière entre les poissons où l'inversion du sexe est complète et fonctionnelle et les mammifères dont le développement gonadique ne présente pas de sensibilité aux stéroïdes. Ainsi, l'étude du modèle poulet pourrait favoriser la compréhension des mécanismes évolutifs de la différenciation gonadique. Outre, l'intérêt pour la recherche fondamentale, la compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation de la gonade de poulet présente un intérêt agronomique. En effet, cette compréhension pourrait conduire à un contrôle du sex-ratio ou à une détermination *in ovo* du sexe des individus ; présentant un intérêt pour l'industrie des poules pondeuses où seuls les poussins femelles sont conservés ou dans l'industrie du foie gras où seuls les individus mâles sont élevés. Actuellement, seul un faible nombre de gènes sont reconnus comme étant impliqués dans la différenciation de la gonade mâle (*DMRT1*, *AMH*, *SOX9*...), dans la gonade femelle (*RSPO1*, *FOXL2*, *CYP19A1*...) (Figure 13) ou dans les mécanismes de l'asymétrie (*PITX2*, *ESR1*...). Dès lors, le premier objectif de ce travail de thèse fut d'identifier de nouveaux gènes candidats pouvant être impliqués dans la mise en place de ces différents mécanismes. Pour cela, il a été réalisé une étude par PCR temps réel de l'expression de 110 gènes (article I, p58). Suite à cette étude, il a notamment été mis en évidence une expression préférentielle de plusieurs membres des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) dans l'ovaire embryonnaire.



Afin de mieux appréhender le rôle de ces BMPs dans le développement gonadique, des expériences fonctionnelles ont été réalisées sur des cultures organotypiques de gonades embryonnaires femelles (article II ; p95) et de gonade mâles (article III ; p116) supplémentées avec une protéine recombinante humaine BMP4. Ces analyses fonctionnelles ont mis en évidence le rôle de BMP4 dans la régulation de la stéroïdogénèse basale et stimulée par la FSH et son rôle dans l'inhibition de l'expression du facteur testiculaire qu'est l'*AMH*.

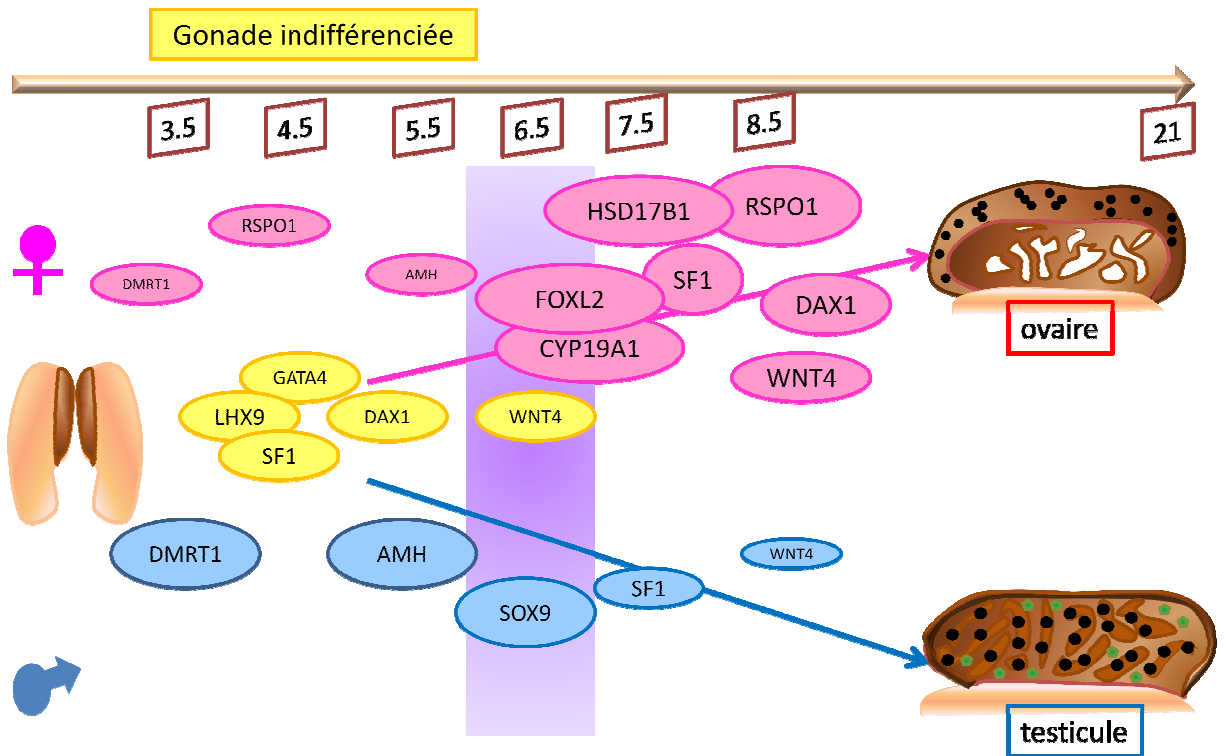


Figure 13 : Expression des gènes impliqués dans la différenciation gonadique (d'après Smith et al., 2004).

Les gènes entourés en jaune présentent des niveaux d'expression similaire entre les deux sexes. Les gènes entourés en rose sont exprimés dans les gonades des femelles ZW tandis que les gènes entourés en bleu sont exprimés dans la gonade des individus mâles. Pour les gènes exprimés dans les deux sexes, la taille des cercles symbolise les niveaux relatifs d'expression entre les deux sexes.

**Partie I : étude des profils d'expression de  
110 gènes au cours de la différenciation  
gonadique chez le poulet**

## **Etude des profils d'expression de 110 gènes au cours de la différenciation gonadique chez le poulet**

*La mention des figures en gras fait référence aux figures intégrées dans l'article.*

### **Résumé de l'étude :**

Afin d'identifier de nouveaux gènes candidats qui seraient potentiellement impliqués dans la différenciation gonadique (différenciation de l'ovaire ou de testicule et mise en place de l'asymétrie) chez le poulet, nous avons développé une analyse à moyen débit de l'expression génique par PCR en temps réel. Dans cette perspective, 110 gènes ont été sélectionnés pour leurs implications dans la différenciation gonadique chez les autres vertébrés complétées dans certains cas par les autres membres de leurs familles. Cette liste est également agrémentée de certains gènes portés par le chromosome Z (ex: *ADAMTS12*, *F2R*, *FANCG*, *GDNF*, *GHR*, *EMB...*). Les profils d'expression de ces gènes ont été mesurés sur des pools de gonades mâles et femelles, droites et gauches prélevées du jour 5.5 au jour 19.5 du développement embryonnaire. Afin de faciliter la comparaison de ces cinétiques d'expression, il a été utilisé une méthode classiquement employée pour les analyses des puces à ADN qu'est la hiérarchisation ou « clustering ».

Dans un premier temps, afin de valider la pertinence du choix des gènes, nous avons classé les échantillons (selon le stade) par une hiérarchisation non supervisée (**Figure 1**). Cette hiérarchisation a permis de classer les pools de gonades en deux groupes principaux correspondant aux échantillons mâles et femelles suggérant que les gènes choisis sont suffisamment représentatifs du phénotype de la gonade. D'autre part, au sein de ces deux groupes, les échantillons sont classés en deux sous-groupes : les échantillons prélevés avant et après le jour 7.5 dans le groupe d'échantillons « femelles » et avant et après le jour 8.5 dans le groupe des échantillons « mâles ». Ceci suggérant que les gènes choisis sont suffisamment représentatifs de la différenciation gonadique pour distinguer la période bipotentielle et la période de différenciation histologique de la gonade. Néanmoins, la limite observée présente un retard par rapport à la date communément admise du jour 6.5.

Par la suite la hiérarchisation supervisée des expressions géniques a permis de classer les gènes en 4 groupes ou clusters (**Figure 2**) : le groupe 1 comporte des gènes à expression préférentielle dans le testicule, les groupes 2 et 3 comportent des gènes à expression préférentielle dans l'ovaire tandis que le dernier groupe (groupe 4) contient des gènes dont l'expression est plus importante dans la période précoce du développement gonadique.

Cette étude a permis d'identifier des gènes dont les profils d'expression sont similaires à celui de *DMRT1* (*DMRT3*, *F2R*, *CFC1*, *INHA*, *FANCG*) ou à celui de l'*AMH* (*NR5A2*, *GHR*, *ADAMTS12* ou *LOC427182*). De la même manière, il a été identifié des gènes dont les profils d'expression sont similaires à l'expression de *FOXL2* et *CYP19A1* (*BMP4*, *BMP7*, *HSD17B4*, *MHM*, *BMP3*, *GDF9*, *SMAD2*). Les profils de certains de ces gènes sont illustrés dans la **figure 3**.

Si certains gènes ont été identifiés comme étant exprimés de manière différentielle dans l'un des deux côtés chez le mâle ou chez la femelle, ces gènes ne sont pas regroupés dans un cluster spécifique. Ceci pouvant s'expliquer par un nombre trop faible de gènes à expression asymétrique et dont les profils d'expression ne sont pas suffisamment similaires pour être regroupés. Comme attendu *PITX2* est plus exprimé dans la gonade gauche chez le mâle comme chez la femelle en accord avec les précédents travaux (Guioli *et al.*, 2007; Ishimaru *et al.*, 2008). De même, un gène ovocytaire, *DDX4*, est également exprimé de manière préférentielle dans les gonades gauches en cohérence avec la colonisation plus importante de ces gonades par les cellules germinales (Van Limborgh, 1968). Certains des profils de ces gènes sont illustrés dans la **figure 4**.

# Gene Expression Profiling Reveals New Potential Players of Gonad Differentiation in the Chicken Embryo and Suggests a Differential Involvement of the Members of Transforming Growth Factor $\beta$ Family in Ovarian and Testis Development.

Gwenn-Aël Carré<sup>1</sup>, Isabelle Couty<sup>1</sup>, Marina Govoroun<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Physiologie de la Reproduction et des Comportements UMR 6175, INRA, CNRS, Université F. Rabelais de Tours, Haras Nationaux, Nouzilly, France

<sup>2</sup> Corresponding author, Marina.Govoroun@tours.inra.fr

## Abstract:

### Background:

In birds as in mammals, a genetic switch determines whether the indifferent gonad develops into an ovary or a testis. However, the understanding of the molecular pathway(s) involved in gonadal differentiation is still incomplete.

### Methodology/Principal findings:

To better characterize the molecular pathway(s) involved in gonadal differentiation in chicken embryo, we developed a large scale real time reverse transcription polymerase chain reaction approach, on 110 selected genes during chicken gonad differentiation covering the period between day 5.5 and 19 of incubation. A hierarchical clustering analysis of the resulting dataset discriminated genes clusters preferentially expressed in the ovary or in the testis, or/and at early or later periods of embryonic gonad development. The temporal expression profile analysis allowed the identification of new potential actors of gonad differentiation, such as the Z-linked *ADAMTS12*, *LOC427192*

(corresponding to NIM1 protein) and *CFC1*, that are upregulated during testis development or the *BMP3* and Z-linked *ADAMTSL1* that are preferentially expressed during ovarian development. Interestingly, the expression patterns of several members of the transforming growth factor  $\beta$  family were sexually dimorphic with inhibin subunits upregulated in the testis and bone morphogenetic protein subfamily including *BMP2*, *BMP3*, *BMP4* and *BMP7*, upregulated in the ovary. This study also highlights several genes displaying asymmetric expression profiles such as *GREM1* and *BMP3* that would be potentially involved in different aspects of gonad left-right asymmetry in birds.

### Conclusion/Significance:

Overall, this study supports the global conservation of vertebrate sex differentiation pathways but also reveals some peculiarities of gene expression patterns during gonadal development in chicken. In particular, our study reveals new candidate genes which could be potential actors of chicken gonadal differentiation and provides evidences of the preferential expression of BMPs in

developing ovary and Inhibins/Activins subunits in developing testis.

## Introduction:

In birds, sex determination is controlled by a genetic ZZ/ZW system in which the female is heterogametic. Avian sex determining mechanism has not been completely elucidated, and no homolog of mammalian sex determining gene SRY has been found in birds. However, a recent study suggested that the gene, *DMRT1* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1), belonging to the zinc-finger like DNA-binding motif (DM) transcription factor family and localized on Z chromosome, acts as male sex determining factor [1]. Although *DMRT1* is essential for testis differentiation, another Z-linked gene could operate upstream of *DMRT1* in the avian male determining pathway. It is also not excluded that a still unidentified female W-linked determinant could be required for ovarian differentiation. Nevertheless, the overexpression of the W-linked candidate sex determinant, *HINTW* (also known as *ASW* or *WPKCI*) in male embryos does not induce ovarian differentiation [2]. Gonadal development in birds is in many aspects similar to that of mammals. As in mammals, the primordial gonads, in birds, develop from the intermediate mesoderm, on the ventromedial surface of the embryonic kidney (mesonephros). Germ cells colonize the genital ridge by day 3.5 and the formation of primitive sex cords occurs by day 5 [3]. The gonads from ZZ and from ZW embryos remain undistinguishable until day 6.5-7 (stage 30 of the Hamburger and Hamilton classification [4]), when the first histological signs of sex differentiation

become visible. This process comprises the thinning of the cortex and development of testicular cords enclosing germ cells in ZZ gonads. In the ZW left gonad, somatic and germ cells proliferate in the cortex which thickens considerably, while the cords of the medulla become vacuolated, forming a so called lacunae. The germ cells of the left ZW gonad enter in meiosis asynchronously from day 15 [5-7]. The meiotic entry of female germ cells is then completed before hatching. Comparative studies demonstrated that genes involved in the sex differentiation pathway are conserved in vertebrates; nevertheless their roles as well as their regulation and expression time-windows during this process can differ. For instance, similar to mammals, *AMH* and *SOX9* are upregulated in chicken testis during gonadal development. However, in contrast to mammals, *AMH* is also expressed in embryonic female gonads in chicken but at a lower level and the onset of its expression precedes that of *SOX9* [8]. Since both proteins are found in Sertoli cells, *SOX9* could act in maintaining of *AMH* expression [9]. In addition, the chicken model presents two particularities. The first one: in contrast to mammals, gonadal differentiation is sensitive to exogenous hormonal manipulations. Indeed, inhibition of *CYP19A1* causes female to male sex reversal [10], while estrogen treatment of ZZ embryos leads to feminization of left gonads and regression of right gonads [11, 12]. These experiments revealed a crucial role for estrogen production during avian ovarian development and the fundamental role of *CYP19A1* expression regulation. A detailed knowledge of molecular actors and mechanisms leading to the activation of *SOX9* and *AMH* expression in male gonads and to *FOXL2* and *CYP19A1* in

female gonads is missing in birds. Furthermore, the target and downstream pathways of these genes are poorly understood. Another particularity of chicken gonadal differentiation resides in its left-right (L-R) asymmetry in the female. In male birds, gonad development results in the formation of two functional testes. In female birds, only the left gonad becomes a functional ovary whereas the right reproductive system regresses. Recent studies revealed that left sided expression of *PITX2*, *RALDH2* and *SFI* leads to the only left sided expression of estrogen receptor alpha (*ESR1*) [11, 13, 14]. So, estrogen production by embryonic ZW gonads promotes left cortical development via *ESR1* and the regression of the right gonad where the expression level of *ESR1* is dramatically decreased. In ZZ gonads which do not produce estrogens, the asymmetry remains silent. However, the others actors of complex molecular mechanisms of gonad asymmetry establishment and the factors involved in gonadal regression remain unknown. In the light of this current knowledge our study aimed at identifying new candidate genes involved in chicken male and female gonad differentiation and in L-R gonad asymmetry in birds. For this purpose, we developed a large-scale real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) approach on 110 selected candidate genes during gonadal differentiation and development in the chicken embryo. These expression profiles were analysed using a standard hierarchical method. The set of candidate genes was selected mainly based on the literature. It included transcription factors, receptors, signalling molecules and enzymes, known to be involved in gonadal development in other vertebrate species and more generally

in reproduction and embryogenesis. Our study reveals many genes that behave differently between sexes and/or stage specific groups including potential new actors of sex gonad differentiation and L-R gonad asymmetry establishment.

## Results

### Global analysis

The raw data set is presented in an online supplement (Supplemental Table 2). For each sampling data, gene expression profiles were obtained on two independent pools of gonads (biological replicates). To determine the consistency of our data, we calculated correlation coefficients ( $r$ ) of biological replicates. The correlation values of biological replicates were ranged from 0.87 to 0.99 (Supplementary figure 1).

Based on the efficiency and specificity of Real-time RT-PCR, 110 genes were finally selected for the time-course study. To assess the biological relevance of the genes assayed, we first performed an unsupervised hierarchical clustering (Fig 1) that generated two large groups of samples corresponding to male and female gonads. In each group, clustering analysis discriminated two subgroups of samples. One, that gathered the earliest samplings (day 5.5 to day 7.5 for female gonads and day 5.5 to day 8.5 for male gonads) and another, that gathered the latest samplings (day 8.5 to day 19.5 for female gonads and day 9.5 to day 19.5 for male gonads). Based on these observations, for the statistical analysis, we chose to discriminate two periods in gonadal development: before day 7 and from day 7.5 respectively named earliest and latest periods. We chose day 7



(corresponding to the stage 30 of the Hamburger and Hamilton classification [4]) as a limit between earliest and latest periods, because at this stage the onset of histological differentiation becomes visible. Inside these groups, almost all the biological duplicates were clustered together, showing the efficiency of the method and confirming the relevance of the samples and genes assayed. Furthermore, inside these classes, globally, the samples are gathered according to whether they come from a right or left gonad suggesting that several genes are differentially expressed between the two sides.

In order to group genes according to the similarity of their expression profiles we also ran a supervised clustering analysis with samples ordered on the basis of the developmental stage time (from day 5.5 to day 19.5) (Fig 2). SAM analysis was carried out in order to identify significant differences between the different expression patterns. This analysis showed that 93.6% of genes displayed a statistically different expression profile in at least one of these comparisons.

### Gene cluster analysis

As shown in Fig 2, analysis of the dendrogram reveals that genes are clustered in four main groups. The first group corresponds to the genes with a highest relative expression (RE) in the testis (node 1). The second group corresponds to genes with a highest RE in late samples associated with preferential RE in the ovary (node 2). The third group contains genes with a highest RE in the ovary (node 3) while the last group corresponds to genes with a highest RE in early samples (node 4). Clusters are

strongly supported by the presence of significant differences in gene expression between samples in particular comparisons which are visualized by colored asterisks on the right of Fig 2.

Cluster C1 (Fig 2) contains forty-one genes and the majority of them display a preferential RE in the testis compared to the ovary. This cluster could be divided into three subgroups: C1.1, C1.2 and C1.3. The genes from subgroup C1.1 could not be characterized by any similarity of their expression profiles. However, few genes show sexual dimorphism. Among them, *SLIT1* is upregulated in testis compared to ovary in samples from day 7.5 (“latest” period) while *NOTCH1* has a higher RE in the testis samples from earliest period. *HSP70* and *DAZL* are significantly upregulated in the ovarian samples compared to the testis in the earliest period.

In the second subgroup, C1.2, six genes are significantly upregulated in the testis compared to the ovary at all studied time periods (*F2R*, *DMRT3*, *CFC1*, *DMRT1*, *FANCG* and *INHA*) and eight genes are upregulated in the testis only in the latest period (*WHSC1*, *RNH1*, *HOXA9*, *IGF2*, *BMP2*, *CLDN11*, *SOX9* and *TSKU*). In addition, the RE of three of these genes increases during testicular development (*CLDN11*, *INHA* and *SOX9*). Interestingly, among genes with preferential higher RE in the testis, seven genes (*WHSC1*, *F2R*, *IGF2*, *CFC1*, *BMP2*, *CLDN11* and *TSKU*) are also downregulated during ovarian development. Representative expression profiles of this subcluster are shown in Fig4 (See *INHA* and *CLDN11*).

The third subcluster C1.3 includes genes which RE is also globally higher in the testis, and in addition, is increased during gonadal development in both sexes. Representative expression profiles of this subcluster are shown in Fig4 (See *ADAMTS12* and *LOC427192*). Similar to AMH profiles, five genes are more expressed in the testis in the two time-periods (*NR5A2*, *GHR*, *ADAMTS12*, *LOC427192* (corresponding to *NIM1* protein) and *PAX5*). The RE of two of these genes, (*NR5A2* and *LOC427192* (corresponding to *NIM1* protein) and of another gene *FGF18*, increased in latest period compared to earliest samples in both sexes. Moreover, in the latest period, six genes are significantly more expressed in testis samples compared to ovarian samples (*INHBA*, *INHBB*, *GDNF*, *GDF2*, *PDGFRA* and *IGFBP4*). In addition, their RE together with that of *GHR* increases during ovarian development. One gene, *SMAD1* presents a sexual dimorphism, with preferential RE in the testis only at earliest stages.

Cluster C2 (Fig3) is characterized by genes whose RE is globally increased during gonadal development. Indeed, eleven genes are upregulated during gonadal development in both sexes (*AQP1*, *NROB1*, *FGF10*, *CYP17A1*, *LHCGR*, *IGF1*, *CYP11A1*, *LOC416998* (corresponding to *NALP1* protein), *EGR1*, *TIMP3* and *PGR*). In the same manner, several genes present a higher RE in latest period compared to earliest samples either in ovarian samples (*DDX4*, *BMPRIB*, *BMP2*, *HSD3B1* and *SMAD7*) or in testis samples (*FSHR*, *TGFBR3*, *NOG* and *EGFR*). In addition, most of the genes forming this cluster is preferentially expressed in the ovary. Six genes are

significantly upregulated in the ovary at earliest as well as at latest periods (*BMP2*, *AR*, *FSHR*, *EGFR*, *LHCGR* and *CGNRRH-R*). The RE of five genes is significantly higher in the ovary compared to the testis in latest period (*FGF10*, *BMPRIB*, *CYP17A1* and *SMAD7* and *LOC416998* (corresponding to *NALP1* protein)). Three genes (*NROB1*, *TGFBR3* and *NOG*) are upregulated in the ovary only at earliest period. Furthermore, five genes show an upregulation of their RE during ovarian development (*DDX4*, *BMPRIB*, *BMP2*, *HSD3B1* and *SMAD7*), whereas four genes are upregulated in testis samples in latest period compared to earliest period samples. Only one gene from this cluster, *DDX4* is preferentially expressed in the testis at earliest stages. Representative expressional profiles of this cluster are shown in Fig4 (See *BMP2* and *AR*).

Cluster C3 (Fig3) is formed by genes preferentially expressed in the ovary compared to the testis including twenty-one genes. Among them, nine exhibit a stronger expression in the ovary in the earliest as well as in the latest period (*BMP4*, *BMP7*, *HSD17B4*, *CYP19A1*, *FOXL2*, *MHM*, *BMP3*, *SMAD2* and *GDF9*). Moreover, five genes are upregulated in the ovary from day 7.5 compared to the testis (*ESR2*, *ADAMTSL1*, *GATA6*, *FGF9* and *FST*). Seven genes (*GNRH1*, *ESR2*, *ADAMTSL1*, *GATA6*, *EMB*, *JAK1* and *TGFBR2*) exhibit an upregulation during ovarian development. Among them *GNRH1*, *JAK1* and *TGFBR2* are in addition more expressed in earliest testis samples compared to earliest ovarian samples and *EMB* is more expressed in the testis at earliest stages and in the ovary at latest stages. Interestingly, among the genes with a preferential RE in the ovary,

five genes are downregulated in the testis during the latest period (*ADAMTSL1*, *BMP4*, *BMP7*, *HSD17B4* and *BMP3*). The representative expression profiles of this cluster are shown in Fig4 (See *BMP3* and *HSD17B4*).

Cluster C4 (Fig3) includes twenty-six genes. More than half of these genes (21 genes) present a significant preferential RE in earliest samples (stages between day 5.5 and 7.5) compared to latest samples. Among them, eleven genes exhibit a higher earliest RE in both sexes (*ACVR2B*, *FRZB*, *ESR1*, *GATA5*, *GREM1*, *PAX2*, *GAL*, *PITX2*, *SST*, *GJAI* and *GATA2*) (See in Fig4 *GREM1* and *PAX2*). Three other genes (*BMP5*, *FSTL1* and *FSHB*) present preferential earliest RE in ovarian samples and six other genes present preferential earliest RE only in testis samples (*NGFB*, *ACVR2A*, *HOXA7*, *WNT4*, *GJB1* and *FOXO1*). Furthermore, the RE of *FOXO3* and *FOXO4* increases during ovarian development whereas the RE of *KIT* increases during testis development. We can also observe that some genes in this cluster present a sexual dimorphism in their expression patterns. Among them, *LOC771762* (corresponding to NTF3 protein) has a sexually dimorphic expression profile in the earliest as well as in the latest samples with significantly highest RE level in the ovary. Six genes (*ESR1*, *GAL*, *GJAI*, *HOXA7*, *FOXO4* and *FOXO1*) are more expressed in the ovary at latest stages. *NGFB* is more expressed in earliest ovarian samples compared to earliest testis samples. The RE of *WNT4* is higher in the testis at earliest stages whereas it is higher in the ovary at latest stages. Furthermore, *KIT*, *BMP5*, *FSTL1* and *ACVR2B* are more expressed in the testis at latest stages.

As described above we also compared gene expression between left and right ovarian and testis samples. We could not determine a specific cluster of asymmetrically expressed genes. This is probably due to the fact that about half of the analyzed genes (54 out of 110) displayed a significant asymmetric expressional profile at least in one left-right side comparison. More than half of the asymmetrically expressed genes (32 of 54 genes) are included in one ovarian cluster (C2) and in the cluster of early regulated genes (C4). For instance, *PITX2* and *DDX4* are upregulated in left gonads of both sexes. Seven genes (*BARX1*, *GDNF*, *DDX4*, *BMP3*, *CGNRH-R*, *PITX2* and *GJAI*) are more expressed in the left ovary (See *BMP3* profile in Fig5) and five genes (*GJB1*, *DDX4*, *GNRH1*, *PITX2* and *HSPB1*) are upregulated in the left testis (See *GJB1* and *GNRH1* profiles in Fig5) in all studied time-periods. At early ovarian stages, nine genes are more expressed on the left (*DAZL*, *WHSC1*, *SMAD7*, *EGRI*, *NOG*, *KIT*, *FSTL1*, *FRZB* and, *LOC771762* (corresponding to NTF3 protein)) while ten genes are more expressed on the right (*F2R*, *NR5A2*, *FGF18*, *LHCGR*, *GNRH1*, *JAK1*, *TGFBR2*, *ACVR2A*, *GREM1*, and *HOXA7*). Moreover at latest ovarian stages, eight genes are up regulated on the left (*IGF1*, *BMP2*, *LOC416998* (corresponding to NALP1 protein), *ESR2*, *ESR1*, *GAL*, *SST* and *ACVR2A*) whereas four genes are more expressed on the right (*PDGFRA*, *CYP11A1*, *NROB1* and *FST*) (See *FST* in Fig5). At earlier testis stages, eight genes are upregulated on the left (*BMPRIA*, *BMPRIIB*, *IGF1*, *BMP2*, *BMP3*, *SST* and *GJAI*) while three genes are more expressed on the right side (*INHBA*, *GATA6* and *ESR2*) (See *ESR2* profile in Fig5). At late testis stages four genes are

more expressed on the left (*PAX5*, *NR5A2*, *IGF2R* and *IGFBP1*) and six genes are more strongly expressed on the right (*NR5A1*, *FGF10*, *CYP11A1*, *CGNRH-R*, *BMP5*, *NGFB*, *GREM1* and *WNT4*) (See *NR5A1* profile in Fig5).

## Discussion

The chicken is an original model species for studying sex determination and differentiation. Indeed, among other model species where the female is heterogametic, only chicken is characterized by a high degree of differentiation of sex chromosomes Z and W which may be considered as functional equivalent of mammalian highly differentiated XY chromosome system where the specific small sex chromosome Y is shared by the male. Obviously, this should have many consequences on the regulation of genes that trigger sex determination and gonadal differentiation in this species. From this point of view and taking in account the others features of embryo development such as the female reproductive system asymmetry and the sensitivity of gonadal development to the estrogens, chicken embryo represents a very attractive comparative model to study molecular mechanisms leading to testis and ovary formation. Our study brings valuable information on the genes involved in chicken gonadal differentiation. To this end, we compared, by real-time RT-PCR, the expression pattern of 110 candidate genes. These expression patterns were analyzed by a clustering method and displayed in a color coded matrix. This method has been already applied to study genes involved in trout gonadal differentiation [13]. First, it is worth noting that the unsupervised classification

is consistent with the genetic sex and with the time of sampling and clearly discriminates two periods in male and female gonad differentiation. The limit between early and late male samples presents a delay compared to the onset of the histological differentiation which occurs between day 6.5 and 7 [14]. This can be explained by the fact that the fold change in the RE of several genes increases or drops in male gonads by day 8.5-9.5. For instance, this is the case of *PAX2*, *GATA2*, *AMH*, *GREM1*, *PITX2*, *SST*, *SOX9*, *DMRT3*, *INHA*, *INHBA*, *INHB*, and *PDGFRA*. Second, supervised clustering discriminated four main gene clusters, three of which (C1, C2 and C3) contain genes exhibiting sexual dimorphism and one cluster, C4, which mainly contains early regulated genes without sexual dimorphism including new potential players (*GATA5*, *SST*, *GREM1*, *FRZB*, *GATA2* and *PAX2*) of the development of bipotential gonad. In the same manner, some genes are upregulated in latest periods in both sexes. This is the case of several genes from cluster 2 as *IGF1*, *AQP1*, *CYP11A1*, *EGR1* and *PGR* from cluster 1.3. These genes could be involved in gonad growth and androgen production.

Estrogens are known to play a critical role in avian sex determination and particularly in cortex ovarian development [15]. So, as expected, in cluster C3 with ovarian specific signature, we found *CYP19A1*, enzyme involved in estrogens production [25-28] and his potential regulator *FOXL2* [16, 17]. In this experiment, we also found that the genes coding for other steroidogenic enzymes are preferentially expressed in the ovary: *CYP17A1* (C2.3) and *HSD17B4* (C3)

consistent with the fact that the embryonic ovary produces more steroids than the testis [23, 26, and 28]. One of the aims of this study was to find new potential regulators of enzymes involved in estrogen synthesis in particular of aromatase as well as estrogen targets. *NGFB* is a member of neurotrophin, growth factors involved in the survival, the maintenance and the development of neuronal cells in central nervous system as well as in peripheral system [18-20]. These neurotrophins are also involved in the function of the reproductive system [21-24]. In rodents and humans, *NGF* mRNA expression begins before primordial follicle formation [23, 25, 26] and it is strongly involved in ovarian development [22, 27-29]. *NGF* seems to be a modulator of steroidogenesis in granulosa cells of mammalian. Indeed, this factor decreases progesterone production and increases estradiol production by regulation of *FSHR* mRNA expression [30-32]. So, in the chicken embryo, the fact that *NGFB* is clustered with *CYP19A1* suggests that *NGFB* could be involved in estrogen level regulation. Moreover, in rat postnatal ovary, the exposure to the estradiol increases the intraovarian *NGFB* expression [33]. Thus, *NGFB* could be regulated by the estrogens during chicken ovarian development. One particularly interesting finding of this study consists in the fact that several members of TGF $\beta$  exhibit sexually dimorphic expression profiles. Indeed, several members of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are more expressed during ovarian development and clustered with *CYP19A1*. That is the case for transcripts of several BMPs signaling molecules (*BMP3*, *BMP4* and *BMP7*). In the same manner, in cluster 2, that also contains genes which RE is higher in the ovary such as *CYP17A1*, we

also found transcripts of signaling BMP molecule (*BMP2*), of one receptor *BMPRII* and one inhibitory *SMAD* (*SMAD7*). It has already been shown that *BMP7* is early expressed (day 4.5/5) in chicken gonadal mesenchyme. This expression becomes female specific from day 8 in the left and right medullae [34], what is globally consistent with our results. Similarly, in trout embryo, *BMP7* is overexpressed in female gonads but *BMP4* is not sexually dimorphic in this species [13]. Moreover, in mouse embryos at the time of gonadal differentiation (day 12.5), *BMP2* is ovarian specific and its expression increases during ovarian development [35, 36]. This expression is not altered by depletion of germ cells, so it is supposed to be in somatic cells [35]. In murine testis cellular culture, *BMP2* and *BMP4* have a mitogenic effect on germ cells so BMPs seems to be involved in germ cell proliferation [37, 38]. Nonetheless, in contrast to the findings in chicken, *BMP7* is more expressed in mouse testis from day 10.5 [39]. So, all these experiments obtained in different vertebrates, show that the sexual dimorphism of *BMPs* expression is not totally conserved. In addition to a role on germinal cell proliferation, in mammalian and in the chicken granulosa cells, it has been shown that BMPs modulate steroid production [40, 41]; so these genes could also be involved in the regulation of steroidogenesis during avian gonadal development. Moreover, *GDF9* another TGF $\beta$  family member also belonging to this ovarian cluster, is an oocyte specific factor in mammalian early-stage follicles and seems to be essential for further follicle progression [40]. Furthermore this factor also regulates steroidogenesis by inhibiting *FSHR* expression [42]. Similarly

to our finding, *FST* has been found overexpressed in the mouse ovary at embryonic day E12.5 which is the time of gonadal differentiation [43, 44]. *FST* generally neutralizes BMPs activities by non competitive receptor binding [45, 46]. Furthermore, in mammals, *FST* acts downstream of *WNT4*, in order to inhibit the coelomic vessel formation that is male specific. In chicken, in contrast to mouse, there is no male specific vessel suggesting another role for *FST* in ovarian development. However, in mouse, *FST* is also involved in maintaining of germ cells in cortical region [35]. So this *FST* role could be conserved in the chicken ovary. Moreover, in this study *WNT4* is found more expressed in male gonads at early stages and in female gonads at later stages. In a previous study *WNT4* have not been found sexually dimorphic and its expression was found downregulated at later embryonic stages [9]. In the present study, we also could observe a significant decrease in *WNT4* expression, but only during testis development. These differences could be due to different methods used for the analysis of mRNA expression. So this experiment highlights that *NGFB* and *BMP* system could be involved in the regulation of steroidogenesis which is crucial for ovarian differentiation. The expression of another gene of ovarian cluster C3, *EMB* belonging to the Ig (Immunoglobulin) superfamily, in chicken embryonic gonads has previously been reported in both sexes at day 8 for the ovary and at day 10 for the testis [47]. In the present study we show that *EMB* is highly upregulated in the embryonic ovary at later stages, but it is preferentially expressed in the testis around the period of morphological differentiation of the gonad. The function of *EMB* during gonadal

development as well as in adult gonads remains unknown. Interestingly, in ovarian clusters, several genes are localized on the Z chromosome and thus are presented in double copy in genetic males ZZ and in unique copy in genetic females ZW (*FST*, *HSD17B4*, *SMAD2*, *SMAD7*, *FGF10* and *EMB*), suggesting that their preferential expression in the ovary is a consequence of specific regulation.

In the C1 cluster, we found genes that are specifically upregulated during testis differentiation. Some of them have been shown to be involved in vertebrate testis differentiation including chicken, (*SOX9*, *DMRT1* or *AMH*) [1, 8, 9, 42-47] and we used these genes to build the testicular cluster C1. The dramatic increase in *AMH* and *SOX9* expressions coincides with the beginning of testis differentiation. *DMRT1*, in chicken as in fish, reptile and mammals is more expressed in embryonic testis [42-46]. *DMRT1* is essential to the initiation of testicular differentiation and could be involved in the development of Sertoli cells forming testicular cords [1, 48]. We found that the genes *FANCG*, *CFC1*, *ADAMTS12*, *LOC427192* (corresponding to NIM1 protein) and *INHA* joined the same cluster and are also preferentially expressed in male gonads during the first steps of male gonad differentiation. Four of these genes (*FANCG*, *CFC1*, *ADAMTS12* and *LOC427192*) are Z linked. The important fold change in the expression level of these Z linked genes between embryonic testis and ovary suggests that their preferential expression in the testis is rather the consequence of their specific regulation than of the effect of the double Z chromosome dosage. So these genes would be good candidates to be early markers of

male chicken gonads. *FANCG* (Fanconi anemia complex G) is a member of a complex formed by *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* and known to regulate germ cell proliferation in mouse [49]. In trout another member of this family, *FANCL*, is more expressed in embryonic testis [13]. *ADAMTS12* (a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs) is particularly interesting, because in addition to its role in the remodeling of extracellular matrix and angiogenesis, this protein has been demonstrated to be an inhibitor of *SOX9* expression during in vitro chondrocyte differentiation [50]. In the same manner *ADAMTS12* could be a modulator of *SOX9* expression during testicular differentiation. The implication of other *ADAMTS* family members in the gonad differentiation and fertility has been reported in invertebrate and mammals. In mouse, *ADAMTS19* is predominantly expressed in the ovary at 8dpp [43] and *ADAMTS1* is required for female fertility and appears to be involved in ovulation [51, 52], whereas *ADAMTS16* is highly preferentially expressed in the mouse testis at E11.5 [51]. Moreover, gonad formation in *C.Elegans* is disrupted when the *ADAMTS* encoding gene *Gon-1* is mutated [52]. So these genes could be involved in bipotential gonad formation as well as in testicular or ovarian development. Interestingly, another member of *ADAMTS* family, also localized on the Z chromosome, *ADAMTSL1* (*ADAMTS*-like 1) was found in this study to be preferentially expressed in the developing ovary (Cluster3). *ADAMTSL1* is the member of *ADAMTSL* proteins subfamily of *ADAMTS* family. In mouse and human *ADAMTSL1* transcript was detected only in skeletal muscle [53]. *ADAMTSLs* are

glycoproteins which, in difference with *ADAMTS*, do not possess any enzymatic domain [54, 55]. Their function is largely unknown, but based on their structure and localization their possible involvement in cell–extracellular matrix adhesion and regulation of *ADAMTS* protease function is proposed [53]. So this study is the first report on the expression and a potential involvement of *ADAMTS12* and *ADAMTSL1* during gonadal development. Another gene from this testis specific cluster, *LOC427192* codes for a Serine/Threonine Kinase named NIM-1 which is a member of the AMPK-related kinase family including also testis specific genes *SNRK* and *TSSKs* [55-57] and this gene is conserved in chimpanzee, dog, cow, mouse, rat, chicken, zebrafish and *C.Elegans*. Little is known about this protein; the NIM-1 expression has been detected in many rat tissues but significant levels of NIM1 activity were observed only in the brain and in the testis [56]. So this gene could have a role in chicken testis differentiation and function. In contrast to the ovarian preferential expression of several *BMPs* during gonadal development found in this study, genes coding for other members of *TGF $\beta$*  family including subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ A and  $\beta$ B of inhibin are upregulated in the developing testis. These subunits are involved in the formation of inhibins ( $\alpha\beta$ A or  $\alpha\beta$ B) or activins ( $\beta$ A $\beta$ A,  $\beta$ A $\beta$ B or  $\beta$ B $\beta$ B). This is the first report on the sexually dimorphic expression of  $\beta$ B *inhibin* subunit during gonadal differentiation and early testis specific expression of  $\alpha$  *inhibin* subunit. Sexually dimorphic expression of *inhibin* subunit  $\alpha$  in the chicken embryonic gonads at later stages has been reported previously [57]. *Inhibin* secretion by the testis has been shown higher compared to that by the

ovary [58, 59]. Inhibin A and activin A have been found to modulate androgen synthesis in testicular cells from 18 day old chicken embryos in vitro [44]. In mammals, the sexual dimorphism in inhibin production and secretion has been found in rat [60], sheep [61], and bovine [62] as well as in human and nonhuman primate [63]. In mouse, activin B has been shown to contribute to the formation of the coelomic vessel, a male-specific artery critical for testis development [64]. However, as mentioned above, such particular vasculature structure is absent in the chicken embryonic testis. Moore et al. hypothesized that inhibins and activins could also regulate the interstitial cells functions and increase spermatogonia proliferation [65]. *CFC1* is an another Z-linked gene upregulated in the testis during overall developmental period and encodes for the co-receptor of another member of TGF $\beta$  family, nodal, which is known to be largely involved in vertebrate embryonic patterning including germ layers and left-right axis specification [66]. In addition to its role of nodal co-receptor, *CFC1* has also been shown to antagonize activin signaling by binding to the complex activin-*ACTRIIA/IIB* and preventing its interaction with *ACTRIB* receptor [67]; so it could regulate activin activities in the developing testis.

This study also highlights many genes asymmetrically expressed between left and right developing gonads. The absence of a specific cluster for these genes could be explained firstly by the fact that they are asymmetrically expressed at different periods of gonadal development and in different sexes. So, only few number of genes exhibit similar asymmetric expression profiles. Secondly,

the clustering is mainly constrained by the differences in gene expression levels in ovarian and testis samples on one hand and in early and later samples on the other hand. As expected, we found that *PITX2* is more expressed in left gonads compared to right gonads in both sexes. *PITX2* has been shown to be involved in the asymmetric development of the ovary [68]. In addition, two genes specific to germ cells, *DDX4* and *DAZL*, are upregulated in the left testis and left ovary and early left ovary respectively. This is consistent with the fact that germ cells colonize more the left side of the intermediate mesoderm than the right side [69]. Furthermore, several other genes are specifically upregulated in the left ovary (*BMP3*, *NOG*, *GDNF* and *CGNRH-R*) or in the left testis (*BMPRII*, *IGF1*, *GNRH1* and *GJB1*). The presence of genes differentially expressed between the right and the left male gonads, which both become functional testes, could reflect the primary asymmetric program present in the gonads of both sexes. Indeed, *PITX2* which is essential for the establishment of the asymmetry is overexpressed in the left side in both sexes [68, 70]. Moreover, the right testis retains the potential for the regression, which could be induced by the estrogens while the left testis develops in an ovary or ovotestis under the same conditions [15, 71, 72]. The genes preferentially expressed in the female left gonad which will become a functional ovary, could play a role in the development of the cortex, which occurs only in the left side. Indeed, genes whose expression is restricted to the medulla as for example those coding for steroidogenic enzymes or *FOXL2* do not exhibit significant asymmetry in their expression patterns. However this potential role in the development of the cortex of female left



side upregulated genes should be confirmed by their cellular localization. Moreover some genes are specifically increased in the right ovary which regresses from day 8; that is the case of *FST*, *SMAD6*, *PAX2* or *FSHB*. These genes could be markers of ovary digenesis.

To conclude, this study draws a picture of gene expression during chicken gonadal development from undifferentiated gonads up to latest embryonic testicular and ovarian stages before hatching, which reveals strong similarities of chicken gonad sex differentiation with that of other vertebrate species as well as several specific features of this process in chicken. This study also identified new candidate genes which could be potential actors of female and male pathways and L-R gonad asymmetry in chicken whose roles should be further investigated. Our findings also suggest that gonad differentiation in chicken involves complex interplay of different members of TGF $\beta$  protein family where the precise function of each molecule remains to be elucidated.

## Materials and Methods

### Animals:

Fertilized eggs from White Leghorn chicken were incubated at 37.8°C and 40% humidity. Then, the eggs were removed every half day between day 5.5 and day 7.5, every day between day 7.5 and 10.5 and every two days between 10.5 and 18.5.

### Tissues collection:

At each stage, the left and the right gonads were dissected separately, put individually in RNAlater® (Ambion) and stored at -20°C. Small piece of extragonadal tissues from each embryo

were dissected, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C prior to sex determination. After sexing of embryos the gonads were pooled according sex, stage and side. Two pools of gonads were combined for each time point analysis. Samples were stored in RNAlater® at -20°C until RNA extraction.

### Genetic sexing of chicken embryos:

Genomic DNA was extracted according to Estoup et al. [73]. Small pieces of tissues were incubated for 2 hours at 55°C in 0.2 ml of 10% Chelex100 resin (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) containing 200 $\mu$ g/ml. proteinase K. After inactivation of proteinase K by heating at 99°C for 10 min, samples were centrifuged at 10,000 g for 1min. PCR sexing was performed on 2  $\mu$ l of genomic DNA as described by Clinton [74].

### Total RNA extraction and Reverse Transcription:

Total RNA was extracted using TRI Reagent (Euromedex, Mundolsheim, France) according to the manufacturer's instructions. RNA quality and concentration were determined using an Agilent 2100 Bioanalyser and the RNA 6000 labchip kit (Agilent technologies, Massy, France) according to the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis, 2  $\mu$ g of total RNA were treated with 1 unit of RQ1 RNase-free DNase (Promega, Charbonnière, France) according to the manufacturer's instructions and then denatured in the presence of the mix of oligodT (250ng) and random hexamers (62.5ng) for 5 min at 70°C. Reverse transcription (RT) was performed first at 25°C for 10 min and next at 42°C for 50 min using Moloney

murine leukemia virus reverse transcriptase in the presence of dNTP (0.5mM) and RNAsin (RNase inhibitor, 20U). (All products from Promega, Charbonnière, France).

### Primer design:

Chicken candidate genes were chosen according to a literature survey on the basis of their involvement in the sex differentiation cascade in vertebrates or more generally in the embryogenesis and reproduction (Supplemental data, table 1). The chicken sequences were searched in international public databases. New chicken genes were verified to be true orthologs of mammalian genes using a reciprocal blast hit strategy [75]. The physical localization of genes identified on chicken chromosomes was retrieved from both mapview [76] and from blat search [77]. The primers were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium) or from Sigma Genosis (St-Quentin Fallavier, France).

### Real time PCR:

Real-time RT-PCR (qPCR) was carried out on an AbiPrism 7000 (Applied Biosystems). Reactions were performed in 20 µl with 200 nM of each primer and 5 µl of a 30X dilution of the RT reaction and the qPCR Mastermix plus for SybrGreenI (Eurogentec, Angers, France). *EEF1A* and *RPL15* were used as reporter genes to normalize expression levels of genes assayed. Two independent runs were performed for each reporter gene. For each set of primers, the efficiency of the PCR reaction (linear equation:  $y = \text{slope} + \text{intercept}$ ) was measured in triplicate on serial dilutions of the same cDNA sample (pool of reverse-transcribed RNA

samples). Real-time PCR efficiency (E for each reaction) were calculated using the following equation ( $E = [10^{-(1-\text{slope})} - 1]$ ). Melting-curve analysis was also performed for each gene to check the specificity of RT-PCR products. The relative amount of the target RNA (R) was then determined using the following equation:

$$R = E^{-Ct_{\text{gene}}} / \text{mean} (Rc1_{EEF1A}, Rc2_{EEF1A}, Rc1_{RPL15}, Rc2_{RPL15})$$

in which, Ct is the cycle threshold and Rc1 and 2 are corrected relative reporter gene expressions for the run 1 and 2 calculated as explained below. In order to take into account only fold changes in the expression levels of reporter genes between samples but not the differences in the expression levels of reporter genes in the sample, the expression levels of reporter genes in each sample (sample<sub>i</sub>) was adjusted against the relative amount of *EEF1A* of the run1 (*EEF1A*-run 1) in one of two, day 14.5 left female gonads samples (LFG-14.5) according to the equation:

$$Rc_{\text{reporter}} = \frac{E_{EEF1A}^{Ct(EEF1A - \text{run 1 in LFG -14.5})}}{E_{\text{reporter}}^{\Delta Ct(\text{reporter})}} \times$$

Where

$$\Delta C_{\text{reporter}} = Ct_{\text{reporter in LFG -14.5}} - Ct_{\text{reporter in sample i}}$$

### Data Analysis:

Real time PCR data were used to classify genes and biological samples using the hierarchical clustering method [78] implemented in the T-mev software (MultiExperiment Viewer). The expression levels were first log-transformed and then the rows (genes) were median-centered and normalized, and the columns (samples)

were normalized. Unsupervised or supervised complete linkage clustering with the Pearson correlation coefficient as a similarity metric was used in order to classify biological samples or to group together genes with a similar expression pattern. In order to distinguish between missing values due to PCR anomalies (grey colour on the fig 3) and undetermined values due to a too weak gene expression level in the samples, we attributed a very low value ( $1 \times 10^{-13}$ ) to these last samples, before proceeding with the clustering. This was done only in the case of data obtained for CYP19A1 transcript measurement in males gonad samples, in which this gene is normally very weakly expressed and therefore is often undetermined by real time RT-PCR. To validate the most significant differences in gene expression profiles, we used the “Significant Analysis for Microarrays” (SAM) software [79]. For all SAM analyses, we used the lowest false-detection rate possible and the associated  $\Delta$  value to determine the list of significant genes whose relative expression differences changed at least by 1.5 fold. The SAM analysis was carried out in order to identify significant differences between the different expression patterns. As the fact that only left ovary becomes completely functional, the comparisons of expression levels between testis and ovary as well as between earliest and latest samples were made using left gonads. We compared: A) all left male and female samples; B) left “early” female and left “early” male samples; C) left “late” female and left “late” male samples; D) left “early” and left “late” female samples E) left “early” and left “late” male samples ; F) left and right female samples; G) left and right “early” female samples; H) left

and right “late” female samples; I) left and right male samples; J) left and right “early” male samples; K) left and right “late” male samples.

## Acknowledgments

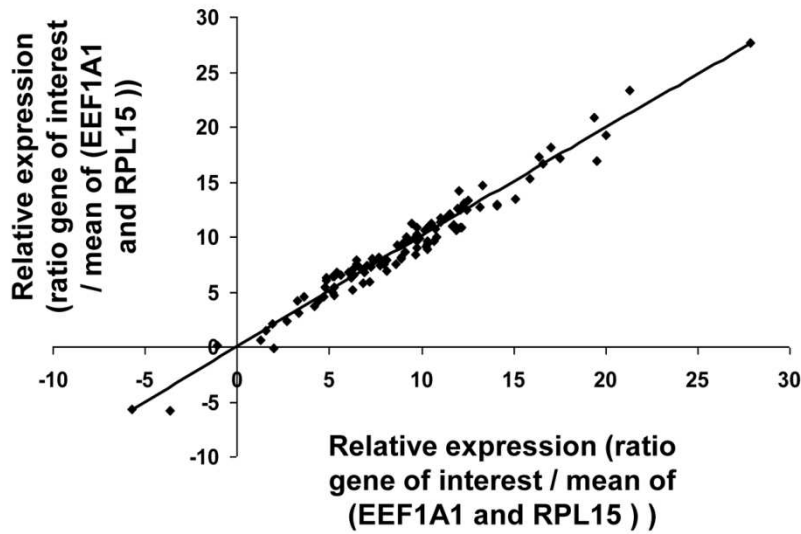
We acknowledge Dr. Corinne Cotinot and Dr. Stéphane Fabre for their advice in listing candidate genes and Dr. Yann Guiguen for his advice in data analysis, fruitful discussion and correction of the manuscript. We acknowledge Dr. Sébastien Tourlet for the participation in the bioinformatic part of the work. We are also grateful to Frederic Mercierand, Mario Tanzi and Jean-Didier Terlot-Bryssine for the eggs production and incubation. We thank Dr. Sonia Mettayer for the IGF1, IGF2 and IGFBP1 primers and Dr. Sébastien Elis for RPL15 primers. We thank Dr. Jean-Pierre Brillard for the helpful advice and moral support.

## References

1. Smith, C.A., et al., The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 2009. **461**(7261): p. 267-71.
2. Smith, C.A., K.N. Roeszler, and A.H. Sinclair, Genetic evidence against a role for W-linked histidine triad nucleotide binding protein (HINTW) in avian sex determination. *Int J Dev Biol*, 2009. **53**(1): p. 59-67.
3. Tsunekawa, N., et al., Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 2000. **127**(12): p. 2741-50.
4. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn*, 1992. **195**(4): p. 231-72.
5. Hughes, G.C., *The Population of Germ Cells in the Developing Female Chick*. *J Embryol Exp Morphol*, 1963. **11**: p. 513-36.
6. Ukeshima, A. and T. Fujimoto, A fine morphological study of germ cells in asymmetrically developing right and left ovaries of the chick. *Anat Rec*, 1991. **230**(3): p. 378-86.
7. Civinini, A. and L. Mastroli, Ultrastructural localization of acid phosphatase in germ cells of chick embryo left ovary. *Exp Cell Biol*, 1986. **54**(2): p. 94-105.
8. Oreal, E., et al., Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn*, 1998. **212**(4): p. 522-32.
9. Oreal, E., et al., Different patterns of anti-Mullerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Dev Dyn*, 2002. **225**(3): p. 221-32.

10. Elbrecht, A. and R.G. Smith, *Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens*. Science, 1992. **255**(5043): p. 467-70.
11. Nakabayashi, O., et al., Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J Mol Endocrinol*, 1998. **20**(2): p. 193-202.
12. Vaillant, S., et al., Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (*Gallus domesticus*) treated with Fadrozole. *Mol Reprod Dev*, 2003. **65**(4): p. 420-8.
13. Baron, D., et al., Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod*, 2005. **73**(5): p. 959-66.
14. Smith, C.A. and A.H. Sinclair, *Sex determination: insights from the chicken*. *Bioessays*, 2004. **26**(2): p. 120-32.
15. Scheib, D., Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation*, 1983. **23** **Suppl**: p. S87-92.
16. Govoroun, M.S., et al., Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev Dyn*, 2004. **231**(4): p. 859-70.
17. Hudson, Q.J., C.A. Smith, and A.H. Sinclair, *Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary*. *Dev Dyn*, 2005. **233**(3): p. 1052-5.
18. Angeletti, R.H. and R.A. Bradshaw, *Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. **68**(10): p. 2417-20.
19. Levi-Montalcini, R., *The nerve growth factor 35 years later*. Science, 1987. **237**(4819): p. 1154-62.
20. Snider, W.D., Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, 1994. **77**(5): p. 627-38.
21. Kawamura, K., et al., Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(26): p. 9206-11.
22. Dissen, G.A., C. Garcia-Rudaz, and S.R. Ojeda, *Role of neurotrophic factors in early ovarian development*. *Semin Reprod Med*, 2009. **27**(1): p. 24-31.
23. Dissen, G.A., et al., Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*, 1995. **136**(10): p. 4681-92.
24. Cupp, A.S., L. Tassarollo, and M.K. Skinner, Testis developmental phenotypes in neurotrophin receptor *trkA* and *trkC* null mutations: role in formation of seminiferous cords and germ cell survival. *Biol Reprod*, 2002. **66**(6): p. 1838-45.
25. Anderson, R.A., et al., *Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(2): p. 890-7.
26. Abir, R., et al., Presence of NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. *Mol Hum Reprod*, 2005. **11**(4): p. 229-36.
27. Dissen, G.A., et al., Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology*, 2001. **142**(5): p. 2078-86.
28. Spears, N., et al., The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development*, 2003. **130**(22): p. 5481-91.
29. Paredes, A., et al., *TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary*. *Dev Biol*, 2004. **267**(2): p. 430-49.
30. Romero, C., et al., Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 2002. **143**(4): p. 1485-94.
31. Mattioli, M., et al., *Nerve growth factor production in sheep antral follicles*. *Domest Anim Endocrinol*, 1999. **17**(4): p. 361-71.
32. Salas, C., et al., Nerve growth factor-dependent activation of *trkA* receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(6): p. 2396-403.
33. Sotomayor-Zarate, R., et al., Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod*, 2008. **78**(4): p. 673-80.
34. Hoshino, A., et al., Sex-specific and left-right asymmetric expression pattern of *Bmp7* in the gonad of normal and sex-reversed chicken embryos. *Dev Growth Differ*, 2005. **47**(2): p. 65-74.
35. Yao, H.H., et al., Follistatin operates downstream of *Wnt4* in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn*, 2004. **230**(2): p. 210-5.
36. Cederroth, C.R., et al., *Genetic programs that regulate testicular and ovarian development*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **265-266**: p. 3-9.
37. Puglisi, R., et al., Regulatory role of *BMP2* and *BMP7* in spermatogonia and Sertoli cell proliferation in the immature mouse. *Eur J Endocrinol*, 2004. **151**(4): p. 511-20.
38. Pellegrini, M., et al., Developmental expression of *BMP4/ALK3/SMAD5* signaling pathway in the mouse testis: a potential role of *BMP4* in spermatogonia differentiation. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 16): p. 3363-72.
39. Ross, A., S. Munger, and B. Capel, *Bmp7 regulates germ cell proliferation in mouse fetal gonads*. *Sex Dev*, 2007. **1**(2): p. 127-37.
40. Knight, P.G. and C. Glistler, *TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development*. *Reproduction*, 2006. **132**(2): p. 191-206.
41. Elis, S., et al., Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary. *J Endocrinol*, 2007. **194**(3): p. 485-97.
42. Shimasaki, S., et al., The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, 2004. **25**(1): p. 72-101.
43. Menke, D.B. and D.C. Page, *Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad*. *Gene Expr Patterns*, 2002. **2**(3-4): p. 359-67.
44. Feijen, A., M.J. Goumans, and A.J. van den Eijnden-van Raaij, Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental functions for different activins. *Development*, 1994. **120**(12): p. 3621-37.
45. Balemans, W. and W. Van Hul, Extracellular regulation of *BMP* signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol*, 2002. **250**(2): p. 231-50.
46. Iemura, S., et al., Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9337-42.
47. Kunita, R., et al., Predominant expression of a Z-chromosome-linked immunoglobulin superfamily gene, *ZOV3*, in steroidogenic cells of ovarian follicles and in embryonic gonads of chickens. *Differentiation*, 1997. **62**(2): p. 63-70.
48. Smith, C.A., M. Katz, and A.H. Sinclair, *DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos*. *Biol Reprod*, 2003. **68**(2): p. 560-70.
49. Nadler, J.J. and R.E. Braun, Fanconi anemia complementation group C is required for proliferation of murine primordial germ cells. *Genesis*, 2000. **27**(3): p. 117-23.
50. Bai, X.H., et al., Regulation of chondrocyte differentiation by *ADAMTS-12* metalloproteinase depends on its enzymatic activity. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(4): p. 667-80.

51. Nef, S., et al., Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol*, 2005. **287**(2): p. 361-77.
52. Belloch, R., et al., The gon-1 gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 1999. **216**(1): p. 382-93.
53. Hirohata, S., et al., Punctin, a novel ADAMTS-like molecule, ADAMTSL-1, in extracellular matrix. *J Biol Chem*, 2002. **277**(14): p. 12182-9.
54. Porter, S., et al., *The ADAMTS metalloproteinases*. *Biochem J*, 2005. **386**(Pt 1): p. 15-27.
55. Apte, S.S., A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysintype) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem*, 2009. **284**(46): p. 31493-7.
56. Jaleel, M., et al., Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS Lett*, 2005. **579**(6): p. 1417-23.
57. Safi, M., et al., Developmental expression of activin/inhibin alpha- and beta(A)-subunit genes in the gonads of male and female chick embryos. *Gen Comp Endocrinol*, 2001. **122**(3): p. 304-11.
58. Rombauts, L., et al., Contribution of the fetal adrenal to circulating immunoreactive inhibin in the chicken embryo. *Biol Reprod*, 1994. **51**(5): p. 926-33.
59. Rombauts, L., et al., Inhibin and activin have antagonistic paracrine effects on gonadal steroidogenesis during the development of the chicken embryo. *Biol Reprod*, 1996. **54**(6): p. 1229-37.
60. Ackland, J.F. and N.B. Schwartz, Changes in serum immunoreactive inhibin and follicle-stimulating hormone during gonadal development in male and female rats. *Biol Reprod*, 1991. **45**(2): p. 295-300.
61. Albers, N., et al., Hormone ontogeny in the ovine fetus. XXIV. Porcine follicular fluid "inhibins" selectively suppress plasma follicle-stimulating hormone in the ovine fetus. *Endocrinology*, 1989. **125**(2): p. 675-8.
62. Torney, A.H., et al., In vitro bioactive and immunoreactive inhibin concentrations in bovine fetal ovaries and testes throughout gestation. *Endocrinology*, 1990. **127**(6): p. 2938-46.
63. Rabinovici, J., et al., Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991. **73**(5): p. 1141-9.
64. Yao, H.H., J. Aardema, and K. Holthusen, Sexually dimorphic regulation of inhibin beta B in establishing gonadal vasculature in mice. *Biol Reprod*, 2006. **74**(5): p. 978-83.
65. Moore, A., L.A. Krummen, and J.P. Mather, Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol*, 1994. **100**(1-2): p. 81-6.
66. Tian, T. and A.M. Meng, *Nodal signals pattern vertebrate embryos*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(6): p. 672-85.
67. Gray, P.C., C.A. Harrison, and W. Vale, Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5193-8.
68. Ishimaru, Y., et al., *Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos*. *Development*, 2008. **135**(4): p. 677-85.
69. Nakamura, Y., et al., Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult Sci*, 2007. **86**(10): p. 2182-93.
70. Guioli, S. and R. Lovell-Badge, PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary. *Development*, 2007. **134**(23): p. 4199-208.
71. Abinawanto, Shimada, K.S., N. Sugishima, T. Shiokawa, E. Sex-reversal effects of non-steroidal aromatase inhibitor on aromatase(P450arom) mRNA expression in adult chicken gonads. *Jpn Poult Sci*, 1997. **34**: p. 158-168.
72. Etches RJ, K.H., *Genotypic and phenotypic sex reversal*. Perspectives in avian endocrinology. *Journal of endocrinology*Ltd, Bristol., 1997: p. 57-67.
73. Etsoup A, P.E., Chourrout D, Rapid one-tube DNA extraction for reliable detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1996. **5**: p. 295-298.
74. Clinton, M., et al., *Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol*. *Br Poult Sci*, 2001. **42**(1): p. 134-8.
75. Blast search, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>.
76. Mapview, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>.
77. Blat search, <http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>.
78. Eisen, M.B., et al., *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(25): p. 14863-8.
79. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(9): p. 5116-21.



Supplementary figure 1: Scatter plots of 110 genes mRNA levels obtained from biological sample duplicates (Left ovary 1 vs Left ovary2; day 12.5).

Each black spot denotes a data point. The diagonal black line denotes the identity  $X=Y$ .

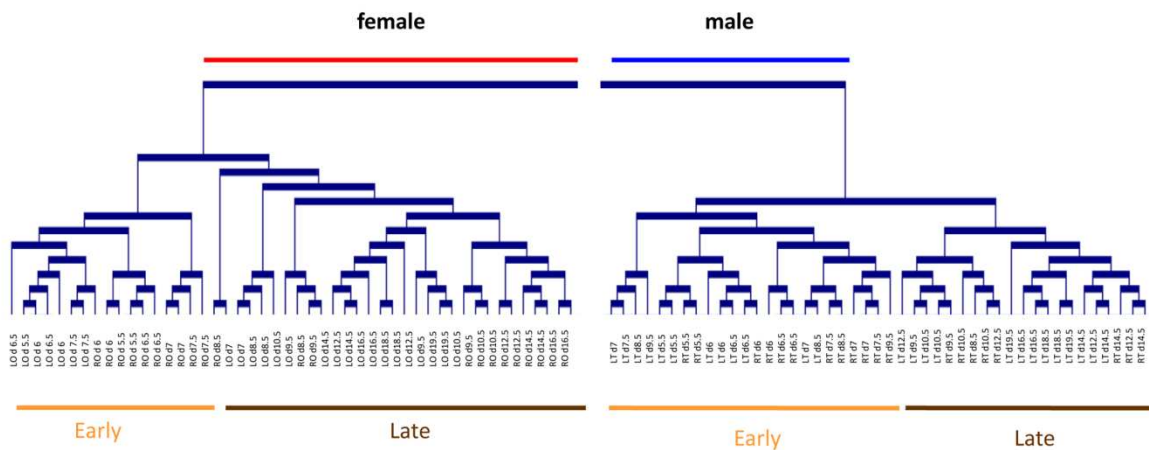
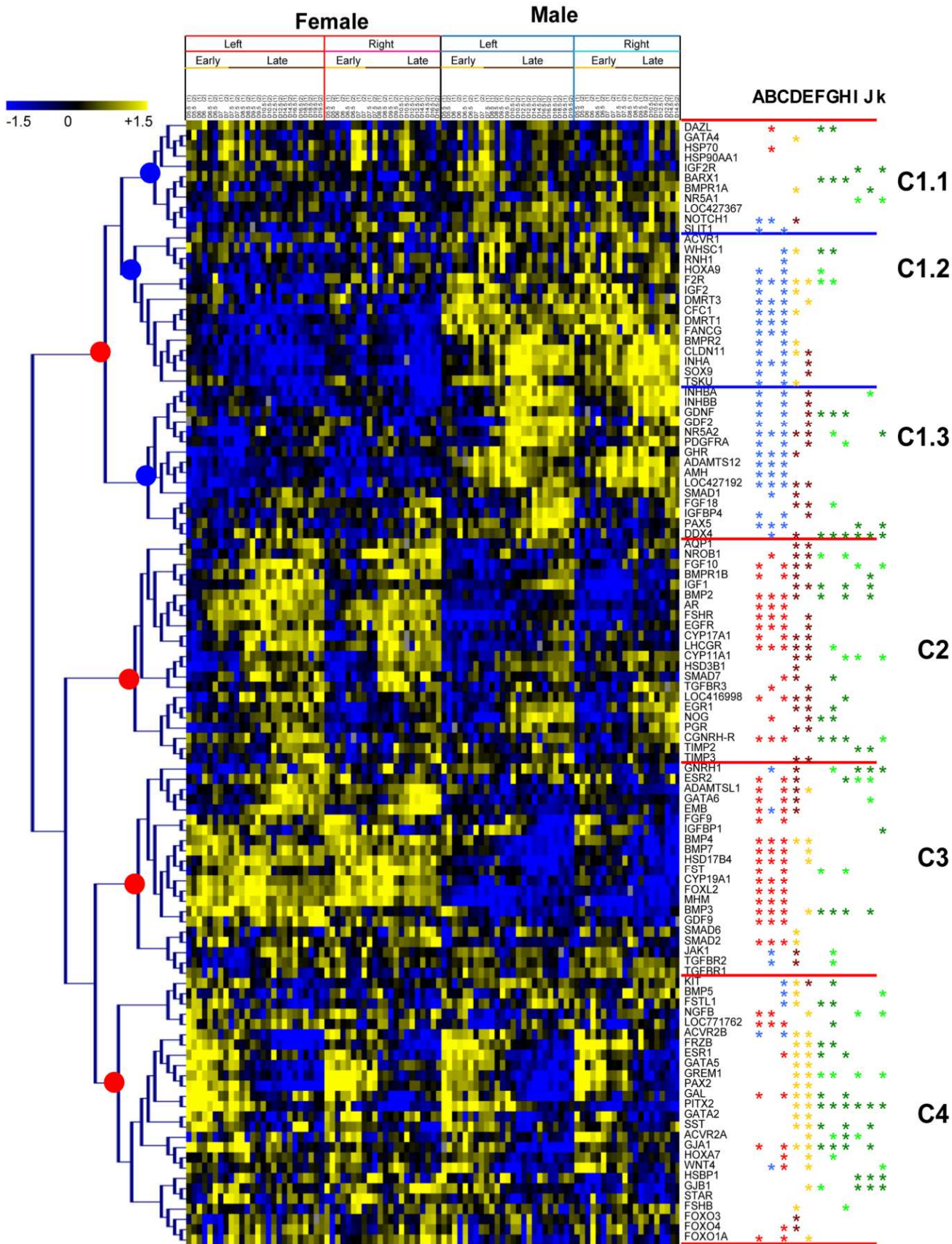


Figure 1: Classification of the biological samples using an unsupervised average linkage clustering of the gene expression profiles.

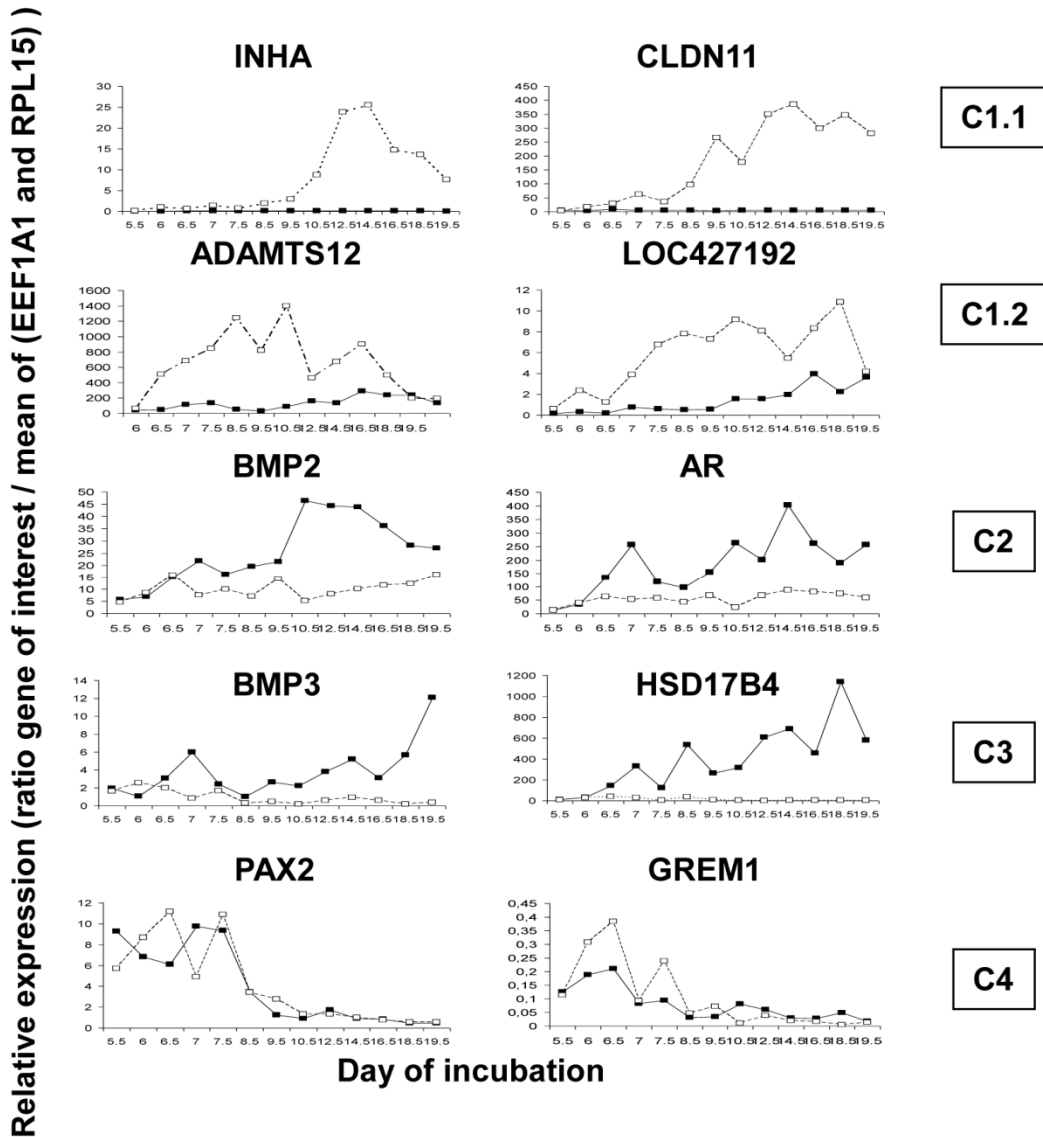
LO: left ovary; RO: right ovary; LT: left testis; RT: right testis



**Figure 2: Supervised average linkage clustering of 110 gene expression profiles in chicken right and left male and female gonads.**

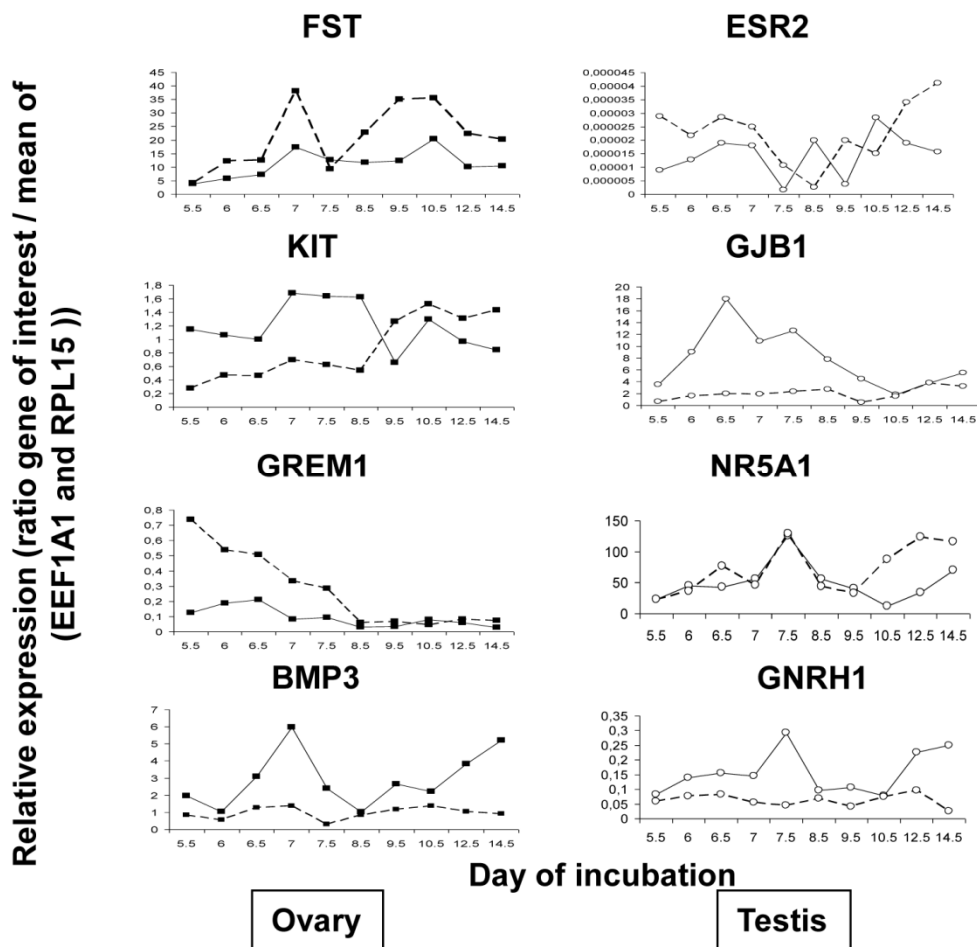
Each row represents a gene, and each column represents a sample. The samples at the top of the image are supervised according to sex (male and female), according to the side (left or right) and according to the development stage time. Each cell in the matrix corresponds to an expression level, with blue for underexpression; yellow for overexpression and black for gene expression close to the median (see the colour scale). The significant genes determined by SAM analysis are represented on the right of the figure. A) Analysis of all left female samples vs all left male samples (FDR: 0.545;  $\Delta$ value: 0.615). B) Analysis of early left female samples vs left early male samples. (FDR: 1.67;  $\Delta$ value: 0.705) C) Analysis of late left female samples vs late left male samples (FDR: 1.173;  $\Delta$ value: 0.664). D) Analysis of early left female samples vs late left female samples (FDR: 12.13;  $\Delta$ value: 0.252). E) Analysis of early left male samples vs late left male samples (FDR: 16.8;  $\Delta$ value: 0.186). F) Analysis of left female samples vs right female samples (FDR: 6.39;  $\Delta$ value: 0.261).G) Analysis of left vs right earliest female samples (FDR: 2.18;  $\Delta$ value: 0.734). H) Analysis of left vs right latest female samples (FDR: 12.81;  $\Delta$ value: 0.294). I) Analysis of left male samples vs right male samples (FDR: 6.25;  $\Delta$ value: 0.383).J) Analysis of left vs right earliest testis samples (FDR: 3.491;  $\Delta$ value: 0.437). K) Analysis of left vs right latest testis samples (FDR: 3.89;  $\Delta$ value: 0.083). Red asterisks indicate an overexpression in female gonads, blue asterisks indicate an overexpression in male samples, brown asterisks indicate an overexpression in late group of samples, orange asterisks indicate an overexpression in early group of samples, dark green asterisks indicate an overexpression in left gonads and clear green indicate overexpression in right group of samples. Genes are grouped on the basis of similarity of their expression pattern across all samples, and particular cluster are quoted on the right side of the picture.





**Figure 3: Expression profiles of some representative genes from the four main clusters (C1 to C4) identified during male and female**

Cluster C1.2: *INHA* (inhibin alpha) and; cluster C1.3: *ADAMTS12* (ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 12) and *LOC427192* (similar to hypothetical protein MGC42105); cluster C2: *BMP2* (bone morphogenetic protein 2) and *AR* (Androgen receptor); cluster C3: *BMP3* (bone morphogenetic protein 3) and *HSD17B4* (Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4); Cluster C4: *PAX2* (paired box 2) and *GREM1* (gremlin 1). For each histogram, female samples are represented by black squares and black lines and male samples by open squares and dotted line. Results are represented with an arbitrary scale as the ratio between the expression of the specific gene and the mean expression of *EEF1A1* and *RPL15*. Each square represents the mean of two different measurements from different biological samples for the same male or female population and same sampling date.



**Figure 4: Expression profiles of some representative genes which present an asymmetric expression between left and right gonad.**

*FST* (Follistatin); *KIT* (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog); *GREM1* (Gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (*Xenopus laevis*)); *BMP3* (bone morphogenetic protein 3); *ESR2* (estrogen receptor 2 (ER beta)); *GJB1* (gap junction protein, beta 1, 32kDa); *NR5A1* (nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1); *GNRH1* (gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)). Male and female expression levels are represented by open circles and black squares respectively. Right and left gonad expression levels are represented by dotted line and black line respectively. Each dot represents the means of two different measurements corresponding to two different biological samples for the same male or female population or same sampling date.

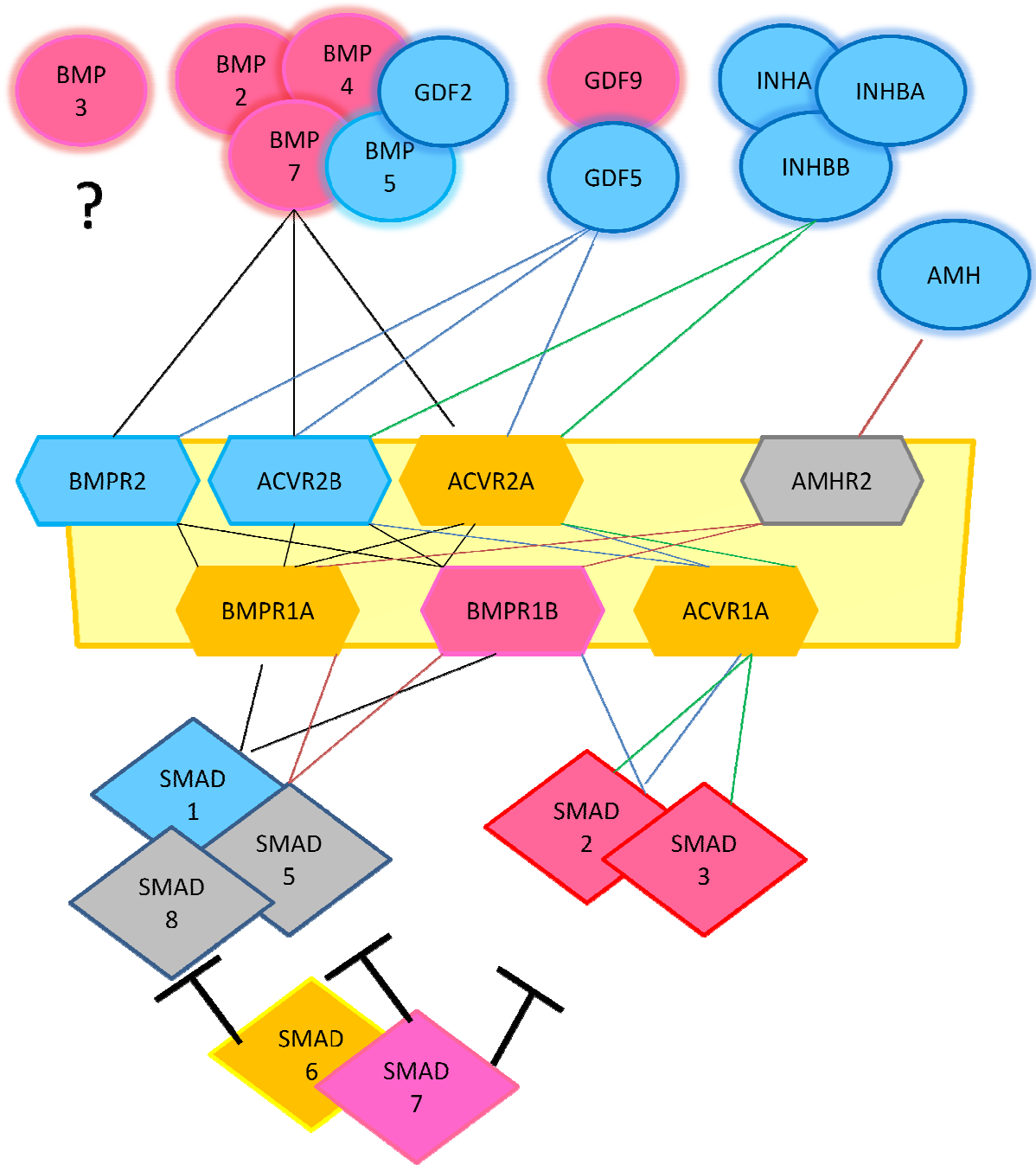


Figure 14 : Représentation de l'expression dimorphique des éléments de la superfamille du TGFβ.

Les éléments roses sont surexprimés dans l'ovaire tandis que les éléments en bleu sont surexprimés dans le testicule au cours de la différenciation du sexe. Les éléments en jaunes sont des éléments de la voie de signalisation des TGFβ qui ne présentent pas de différences d'expression entre les gonades des deux sexes et les éléments en gris n'ont pas été étudiés.

## Discussion et perspectives :

Parmi les gènes identifiés comme préférentiellement exprimés dans le testicule en différenciation, *LOC427182* apparaît comme un candidat particulièrement intéressant. D'une part, il est retrouvé dans le même groupe que l'*AMH*. D'autre part, il code pour une protéine similaire à une sérine/thréonine kinase qu'est NIM1. Or chez le rat, l'expression de ce gène est retrouvée dans de nombreux tissus mais l'activité de la protéine n'a été observée qu'au niveau du cerveau et du testicule (Jaleel *et al.*, 2005). Des premières analyses préliminaires réalisées par immunohistochimie sur des coupes de gonades embryonnaires de poulet tendent à confirmer la traduction préférentielle de cette protéine lors de la différenciation testiculaire. Dans ce cluster contenant l'*AMH* se trouve également le gène *ADAMTS12* qui est porté par le chromosome Z. Ce gène code pour une métalloprotéase impliquée dans les mécanismes de remodelage de la matrice extracellulaire et pourrait ainsi participer à la réorganisation de la médulla lors de la mise en place des cordons séminifère au cours de la différenciation du testicule chez le poulet. D'autre part, dans les chondrocytes, *ADAMTS12* est un inhibiteur de l'expression de *SOX9* (Bai *et al.*, 2009), suggérant que ce gène pourrait également, dans le testicule embryonnaire de poulet, participer à la régulation de l'expression de ce gène testiculaire

Une des observations majeures de cette étude est la mise en évidence d'un dimorphisme sexuel dans l'expression des gènes codant pour des membres de la superfamille du TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta). En effet, plusieurs gènes de la sous-famille des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) sont préférentiellement exprimés dans l'ovaire tandis que les gènes de la sous-famille des inhibines /activines sont préférentiellement exprimés dans le testicule (Figure 14). Le fait que *BMP4*, *BMP3* et *BMP7* soient regroupés dans le même cluster que *CYP19A1* et son régulateur potentiel *FOXL2* et que *BMP2* et un de leurs récepteur *BMPR2* soient exprimés dans le même cluster que *CYP11A1* et *CYP17A1* suggèrent que ces molécules pourraient réguler la stéroïdogénèse comme observés dans les cellules de granulosa des mammifères et de la poule (Onagbesan *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2006; Al-Musawi *et al.*, 2007; Elis *et al.*, 2007). L'expression préférentielle de *BMP7* est en accord avec les travaux d'Hoshino *et al.* qui montrent par *hybridation in situ* que ce gène est exprimé de façon similaire dans les gonades des deux sexes au jour 5 et est à partir du jour 8 détecté que dans la médulla de l'ovaire gauche (expression faible dans l'ovaire droit et absente dans le testicule) (Hoshino *et al.*, 2005).

Cette expression dans la médulla, lieu d'expression des enzymes de la stéroïdogénèse (Nishikimi *et al.*, 2000) renforce l'hypothèse d'une action des BMPs sur la stéroïdogénèse. D'autre part, *BMP7* et *BMP3* sont préférentiellement exprimés dans l'ovaire gauche qui deviendra l'ovaire fonctionnel renforçant l'hypothèse que ces BMPs participent à la différenciation de l'ovaire.

De plus, au cours de la différenciation gonadique, les gènes codant pour les sous-unités des Inhibines et des Activines ainsi qu'un de leurs récepteurs ACVR2B sont préférentiellement exprimé dans le testicule en accord avec des études précédentes (Rombauts *et al.*, 1993). En effet, la sous-unité  $\alpha$  des Inhibines est plus exprimé dans le testicule au jour 14, 18 et 21 (Safi *et al.*, 2001). De plus, lors de cultures dissociées des gonades embryonnaires au jour 18, les cellules testiculaires sécrètent des niveaux plus élevés d'inhibine que les cellules ovariennes (Rombauts *et al.*, 1996). Chez les mammifères, l'activine induit la prolifération des cellules germinales dans les co-cultures cellules germinales-cellules de Sertoli de rat tandis que l'Inhibine limite la prolifération des spermatogonies de souris ou de hamster (van Dissel-Emiliani *et al.*, 1989; Mather *et al.*, 1990). D'autre part, l'Activine lors de ces co-cultures chez le rat, entraîne une réorganisation des structures ressemblantes aux tubes séminifères suggérant que l'activine participerait à la mise en place de ces structures dans le testicule embryonnaire (Mather *et al.*, 1990).

Ainsi les BMPs pourraient être nécessaires au développement ovarien et les activines /inhibines pourraient être impliqués dans le développement testiculaire. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le gène codant pour la follistatine qui est un antagoniste préférentiel de la voie des Activines soit plus exprimé dans l'ovaire que dans le testicule. D'autre part, c'est la première étude montrant que les SMADs (effecteurs intracellulaires de la signalisation des membres de la superfamille des TGF $\beta$ ) sont exprimés au cours de la différenciation gonadique du poulet, suggérant que ces voies de signalisation peuvent être fonctionnelles.

*Parce que ces molécules de la superfamille du TGF $\beta$  sont impliquées dans de nombreux processus de la reproduction (Fabre et al., 2006; Knight et al., 2006) et notamment via une régulation de la stéroïdogénèse qui joue un rôle important lors de la différenciation gonadique chez le poulet, nous avons focalisé la suite du travail de thèse sur l'étude fonctionnelle d'un des membres de la famille des BMPs qu'est BMP4.*

## **Partie II : Etude de l'implication de BMP4 au cours de la différenciation gonadique chez le poulet**

## I- Présentation générale du système TGF $\beta$

Cette présentation non exhaustive du système des TGF $\beta$  est basée sur les revues suivantes: (Massague, 1998; ten Dijke *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003; Massague *et al.*, 2005; Gazzo *et al.*, 2006; Itman *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006; Onagbesan *et al.*, 2009).

### 1- Présentation du système TGF $\beta$

#### *a- Les ligands*

La superfamille des TGF $\beta$  contient une quarantaine de ligands extracellulaires qui sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques au cours du développement embryonnaire comme chez l'adulte. En effet, ils sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire, dans la différenciation cellulaire, dans le développement embryonnaire et en particulier dans la mise en place des asymétries, dans les phénomènes d'adhésion ou de mobilité cellulaires. Au sein de cette superfamille, il est retrouvé des sous-familles que sont les TGF $\beta$ s (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3), les BMPs, les GDFs (growth differentiation factors), les activines et les inhibines (activine A ( $\beta$ A $\beta$ A), activine B ( $\beta$ B $\beta$ B), activine AB ( $\beta$ A $\beta$ B), inhibine A ( $\alpha$  $\beta$ A) et inhibine B ( $\alpha$  $\beta$ B)) les GDNFs (glial cell derived neurotrophic factor), Nodal ainsi que l'AMH. Ces ligands agissent en formant des homo- ou hétéro-dimères grâce à des ponts disulfures. En effet, ces ligands possèdent dans leur séquence sept cystéines dont six vont permettre la formation de trois ponts disulfures internes tandis que la dernière cystéine va s'associer à la septième cystéine d'une autre unité permettant la dimérisation. Certaines expériences suggèrent que l'hétérodimérisation entraînerait une signalisation plus efficace que celle exercée par les homodimères.

#### *b- Les récepteurs*

Les ligands extracellulaires dimérisés se lient à une association de deux récepteurs de type 1 et deux récepteurs de types 2. Ces récepteurs transmembranaires présentent dans leur région intra-cytoplasmique des activités serine/thréonine kinase. La liste de ces récepteurs et des ligands qui s'y rapportent est illustrée par le Tableau 1.

Récepteur de type I	Récepteur de type II	Ligands	R-SMADs
ALK1	TGFBRII	TGFβs BMPs	1, 5 et 8
ACVR1A (ALK2)	ACVRIIA ACVRIIB BMPRII	GDFs BMPs Activines	1, 5 et 8
BMPR1A (ALK3)	ACVRIIA ACVRIIB BMPRII	GDFs BMPs	1,5 et 8
ACVR1B (ALK4)	ACVRIIA ACVRIIB	TGFβs Activines Nodal BMPs	2 et 3
ALK5	ACVRIIB TGFBRII	TGFβs Activines	2 et 3
BMPR1B	ACVRIIA ACVRIIB TGFBRII	BMPs GDFs	1,5 et 8
ALK7	ACVRIIA ACVRIIB TGFBRII	Nodal TGFβs Activines	1.5 et 8

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des récepteurs utilisés par les ligands du système TGFβ (d'après Itman et al., 2006).



Les mécanismes d'activation de ces récepteurs diffèrent pour les BMPs et les sous-familles des TGF $\beta$  et Activines. Les BMPs présentent une affinité plus importante pour les récepteurs de type 1. L'activation des récepteurs de type 1 augmente leurs affinités pour les récepteurs de type 2. A l'inverse, les TGF $\beta$ s et les Activines ont une forte affinité pour le récepteur de type 2 et aucune affinité pour le récepteur de type 1 lorsqu'ils n'y sont pas associés. Lorsque les récepteurs de type 1 et de type 2 se sont liés, le récepteur de type 2 qui est constitutivement actif phosphoryle la séquence GS (TTSGSGSG) présente dans la région intra-cytoplasmique du récepteur de type 1, le rendant actif (Wells *et al.*, 1999; Gilboa *et al.*, 2000).

### *c- Les effecteurs cellulaires*

Les récepteur de type 1 ainsi activés vont phosphoryler les effecteurs intracellulaires que sont les R-SMADs (mother against decapentaplegic Drosophila). Les TGF $\beta$ s et Activines vont induire via leurs récepteurs la phosphorylation des SMADs 2 et 3 tandis que les BMPs et l'AMH induisent la phosphorylation des SMADs 1,5 et 8. Ces R-SMADs phosphorylées vont se lier à une SMAD commune qu'est SMAD4. L'association des R-SMADs avec la SMAD commune va être transloquée au noyau afin d'activer la transcription de gènes cibles. Il existe également deux SMADs inhibitrices, SMAD6 et SMAD7 qui peuvent se lier aux récepteurs mais ne sont pas phosphorylables.

### *d- Les antagonistes*

Il a été identifié différents antagonistes extracellulaires de la voie des TGF $\beta$  qui se lient aux ligands interférant avec leurs capacités de liaison aux récepteurs limitant ainsi leurs activités.

La follistatine est un antagoniste qui a une forte affinité pour les Activines et plus faiblement pour les BMPs (Thompson *et al.*, 2005).

Noggin est antagoniste spécifique des BMPs qui se lient avec une forte affinité pour BMP2/4 et plus faiblement pour BMP7 (Zimmerman *et al.*, 1996).

Chordin est également un antagoniste des BMPs se liant à BMP2/BMP4 (Piccolo *et al.*, 1996). D'autre part, Tolloïd/BMP1 code pour une métalloprotéase exerçant une activité chordinase. Le clivage de chordin entraîne alors une libération des formes actives des BMPs favorisant leurs actions (Larrain *et al.*, 2000). L'action de BMP1 sur la biodisponibilité des BMPs a été étudiée en choisissant un modèle dans lequel l'action des BMP est bien documentée et que sont les cellules de granulosa ovines. Cette étude est présentée en annexe de cette thèse.

Les membres de la famille DAN (DAN, Cerberus, Gremlin, Caronte) sont des antagonistes de la voie des BMPs et des Activines (Harland *et al.*, 1997).

L'existence de pseudo-récepteurs intervient également dans la régulation de la signalisation par les membres de la superfamille du TGF $\beta$ . Les betaglycans et les endoglines sont des protéines transmembranaires sans activité enzymatique (Lopez-Casillas *et al.*, 1991; Cheifetz *et al.*, 1992). Ces molécules peuvent d'une part faciliter l'interaction du TGF $\beta$ 2 à leurs récepteurs de type 2 favorisant leur signalisation mais elles peuvent également se lier à l'Inhibine favorisant dès lors une liaison des Activines et des BMPs à leurs récepteurs (Lewis *et al.*, 2000; Wiater *et al.*, 2003).

BAMBI (BMPs and Activins Membrane-Bound Inhibitor) est un pseudo-récepteur qui se lie à certains récepteur de type 1 mais ne possédant pas d'activité kinase, il ne pourra induire la phosphorylation de ce récepteur de type 1 bloquant ainsi la transduction du signal (Gumienny *et al.*, 2002).

Cripto est un corécepteur pour la voie de signalisation de nodal. Nodal et les Activines utilisent les mêmes récepteurs; cependant lorsque Nodal est lié à Cripto, il augmente son affinité pour le récepteur favorisant son interaction en défaveur de celle des Activines (Gray *et al.*, 2003).

## **2- Implication dans la gonade mâle**

### ***a- Implication dans le testicule embryonnaire***

Au cours de la différenciation gonadique, l'implication des membres de la superfamille du TGF $\beta$  a principalement été démontrée pour leurs régulations de la gamétogénèse.

Les BMPs seraient impliqués dans la formation des cellules germinales primordiales au sein de l'épiblaste. En effet, chez la souris l'invalidation de BMP4 et BMP8 entraîne une absence de développement des cellules germinales (Lawson *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2001) tandis que l'invalidation de BMP2 conduit à une diminution du nombre de ces cellules (Zhao *et al.*, 2002). Les BMPs participeraient à la spécification de la lignée des cellules germinales primordiales dans l'épiblaste.

Les TGF $\beta$  seraient également impliqués dans les phénomènes de survie des cellules germinales. TGF $\beta$  1 et 2 sont exprimés par les cellules de Sertoli embryonnaires de rat au jour 14.5 post-coïtum et induiraient l'apoptose des cellules germinales par l'inhibition de la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Lawrence, 1996; Olaso *et al.*, 1998; Cupp *et al.*, 1999).

De plus, au cours du développement du testicule embryonnaire de souris, il est observé une augmentation de l'expression des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des inhibines /activines avec une augmentation plus importante de la sous-unité  $\alpha$  suggérant une expression préférentielle des inhibines (Small *et al.*, 2005).

#### ***b- Implication dans le testicule post-natal***

Les Activines et les Inhibines influencent le développement et la fonction du testicule en régulant la sécrétion de la FSH par l'hypophyse (Cook *et al.*, 2004; de Kretser *et al.*, 2004) mais ils présentent également des effets paracrines.

Les activines (Boitani *et al.*, 1995; Buzzard *et al.*, 2003), chez le rat, augmentent la prolifération des cellules de Sertoli induite par la FSH et d'autre part, entraînent la prolifération des spermatogonies lors de co-culture avec des cellules de Sertoli (van Dissel-Emiliani *et al.*, 1989). Cependant, l'ajout de follistatine qui bloque l'activité des activines sur ces co-cultures montre une augmentation des spermatogonies sans changement du nombre de gonocytes suggérant que la diminution des activines serait nécessaire à la différenciation des gonocytes (Meehan *et al.*, 2000).

Le GDNF, sécrété par les cellules de Sertoli de souris (Tadokoro *et al.*, 2002), intervient dans le maintien des spermatogonies à l'état indifférencié (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005). De plus l'invalidation de ce gène chez la souris entraîne une infertilité avec un stock de spermatogonies qui ne poursuivent pas leur différenciation et qui finissent par entrer en apoptose.

Les TGF $\beta$ 1, 2 et 3 participent à la régulation de la formation de la barrière hémato-testiculaire. En effet, TGF $\beta$ 3 perturbe cette mise en place en diminuant le nombre de tight-junctions (Lui *et al.*, 2001, 2003a; Lui *et al.*, 2003b)

### 3- Implication dans la gonade femelle

Les membres de la superfamille du TGF $\beta$  sont impliqués dans de nombreux aspects du développement folliculaire chez les mammifères comprenant le recrutement des follicules primordiaux, la prolifération des cellules de granulosa et des cellules thécales, les phénomènes d'atrésie, la régulation de la stéroïdogénèse, l'expression des récepteurs aux gonadotropines, la maturation ovocytaire, l'ovulation et la lutéinisation. Quelques un de ces aspects seront présentés ici.

Chez la plupart des mammifères, la réserve ovarienne en follicules primordiaux est établie pendant la vie embryonnaire. La sortie des follicules de cette réserve débute pendant la vie embryonnaire et se poursuit pendant la vie adulte jusqu'à l'épuisement de la réserve et l'arrêt de la folliculogénèse.

#### a- Les facteurs ovocytaires

*GDF9*, *BMP15* et *BMP6* sont exprimés par les ovocytes des follicules primaires des rongeurs et des follicules primordiaux des ruminants (McGrath *et al.*, 1995; Bodensteiner *et al.*, 1999; Jaatinen *et al.*, 1999; Elvin *et al.*, 2000; McNatty *et al.*, 2000) ainsi que par les ovocytes des poules adultes (Johnson *et al.*, 2005; Elis *et al.*, 2007). Ces gènes sont impliqués dans la progression folliculaire ; en effet l'invalidation du gène *GDF9* chez la souris entraîne une infertilité avec un arrêt du développement folliculaire au stade primaire (Dong *et al.*, 1996). De même, les mutations naturelles de *BMP15* et *GDF9* chez la brebis entraînent une hyper-proliférence à l'état hétérozygote et une stérilité à l'état homozygote (Galloway *et al.*, 2002; McNatty *et al.*, 2005a, b).

D'autre part ces facteurs ovocytaires régulent la stéroïdogénèse stimulée par la FSH. En effet, *GDF9*, *BMP6* et *BMP15* diminuent la sécrétion de progestérone induite par la FSH dans les cellules de granulosa de rats en diminuant l'activité de l'adénylate cyclase (activée par la FSH) et en diminuant l'expression du récepteur à la FSH (Vitt *et al.*, 2000; Otsuka *et al.*, 2001a; Otsuka *et al.*, 2001b).

De plus *GDF9* est également inhibiteur de l'activité de l'aromatase (Yamamoto *et al.*, 2002). De façon similaire, chez le poulet, *BMP15* inhibe la synthèse de progestérone induite

par la FSH mais inhibe également la production basale (Elis *et al.*, 2007). Néanmoins, à la différence des mammifères, BMP15 stimule l'expression des récepteurs LHR et FSHR (Al-Musawi *et al.*, 2007).

### ***b- Les inhibines/activines***

Les follicules ovariens des mammifères expriment les sous-unités du système activine/inhibine au stade de follicule primaire pour les sous-unités  $\beta$ B, au stade de follicule secondaire pour les sous-unités  $\alpha$  et l'antagoniste qu'est la follistatine ainsi que les sous-unités  $\beta$ A au stade de follicule à antrum (McNatty *et al.*, 2000; Montgomery *et al.*, 2001).

Les activines interviennent dans la croissance folliculaire *in vitro* des follicules pré-antraux de souris (Smitz *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999) et du rat (Zhao *et al.*, 2001) en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules de granulosa (Li *et al.*, 1995; Miro *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2001). Cependant, l'activine ne régule pas la progression des follicules primaires ou secondaires chez les bovins comme le montre le nombre constant de ces follicules lors des cultures de cortex d'ovaires fœtaux (Fortune *et al.*, 2000).

D'autre part, les activines interviennent dans la régulation de la stéroïdogénèse. En effet, l'activine stimule l'activité de l'aromatase et la production d'œstradiol et inhibe la production de progestérone par les cellules de granulosa bovines en culture et retarderaient ainsi les phénomènes d'atrésie et de lutéinisation (Li *et al.*, 1995; Miro *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2001). De plus, l'activine régule l'expression du récepteur à la FSH dans les cellules de granulosa de rats (Xiao *et al.*, 1992). Chez le poulet, les activines stimulent l'expression des récepteurs aux gonadotropines (LHR et FSHR) dans les cellules de granulosa des follicules pré-hiérarchiques (Johnson *et al.*, 2006). Cependant, à l'inverse des mammifères, l'activine A augmente la production de la progestérone (Davis *et al.*, 2001).

Les actions des inhibines varient selon les espèces. En effet, l'inhibine A augmente la production d'œstradiol induite par la FSH dans les cellules de granulosa des brebis (Campbell *et al.*, 2001) mais inhibe cette synthèse dans les cellules de granulosa des bovins (Jimenez-Krassel *et al.*, 2003). D'autre part, les inhibines stimulent la production des androgènes par les cellules thécales des follicules humains, bovins, ovins et des rongeurs (Hsueh *et al.*, 1987; Hillier *et al.*, 1993; Wrathall *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2001).

Chez le poulet adulte, la sous-unité  $\alpha$  est peu exprimée au cours de la période pré-pubère et son expression augmente juste avant la mise en place de la puberté suggérant que

l'inhibine jouerait un rôle dans ces mécanismes (Lovell *et al.*, 2000, 2001; Onagbesan *et al.*, 2004). Dans les cellules de granulosa cultivées des follicules hiérarchiques F4/F5, les hormones gonadotropes augmentent l'expression des sous-unités  $\alpha$  mais sans changement des niveaux de protéines sécrétées (Davis *et al.*, 2000). L'Inhibine A n'a pas d'effet sur l'expression des récepteurs LHR et FSHR (Johnson *et al.*, 2006).

### *c- Les TGF $\beta$*

Chez les ovins, les 3 isoformes des TGF $\beta$  sont exprimés par l'ovaire. Par exemple, chez l'ovine, elles sont exprimées par les cellules de granulosa des follicules primaires et par les cellules thécales des grands follicules à antrum (McNatty *et al.*, 1999; Montgomery *et al.*, 2001). Les effets de ces TGF $\beta$  sont variables selon les espèces et les stades folliculaires et peuvent induire ou inhiber la prolifération des cellules de granulosa et des cellules thécales (Skinner *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1991; Lerner *et al.*, 1995).

Les TGF $\beta$  agissent sur la stéroïdogénèse en augmentant la production d'œstradiol induite par la FSH et en inhibant la synthèse de progestérone dans les cellules de granulosa de rats (Zhang *et al.*, 1988) ou en diminuant la production d'androgènes par les cellules thécales bovines via une inhibition de l'expression de CYP17A1 (Magoffin *et al.*, 1995).

D'autre part, les effets mitogènes de l'œstradiol sur les cellules de granulosa de rat sont médiés par les TGF $\beta$  (Dorrington *et al.*, 1993). De plus, les TGF $\beta$  augmentent la sensibilité des follicules aux hormones gonadotropes en augmentant l'expression de leurs récepteurs (Kim *et al.*, 1989).

Chez le poulet adulte, les trois isoformes sont également détectées dans les cellules de granulosa et de la thèque (Law *et al.*, 1995) et interviendraient dans la croissance et la sélection folliculaire en augmentant la sensibilité aux gonadotropines en stimulant l'expression de FSHR et LHR par les cellules de granulosa en culture (Johnson *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005). De même, TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 2 sont impliqués dans la croissance ovarienne embryonnaire (Mendez *et al.*, 2006).

### *d- Les BMPs*

Les membres des BMPs sont exprimés par les cellules de granulosa et thécales des mammifères et sont impliqués dans la régulation de la stéroïdogénèse. En effet, BMP2 augmente la production d'œstradiol par les cellules de granulosa ovines (Souza *et al.*, 2002) alors que BMP4, 6 et 7 augmentent cette production après stimulation par l'IGF1 dans les

cellules de granulosa bovines (Shimasaki *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001). De plus, ils sont des inhibiteurs de la production de progestérone qu'elle soit basale ou induite par la FSH dans les cellules de granulosa ovines (Pierre *et al.*, 2004). Ils sont également des inhibiteurs de la production des androgènes par les cellules thécales bovines (Dooley *et al.*, 2000; Glister *et al.*, 2005) ou porcines (Brankin *et al.*, 2005).

BMP4 et BMP7 sont exprimés par les cellules de la thèque chez le rat (Shimasaki *et al.*, 1999), des bovins (Glister *et al.*, 2004) alors que BMP3 est exprimé par les cellules lutéinisées humaines (Jaatinen *et al.*, 1996).

Chez la poule, BMP 2, 4, 6 et 7 sont exprimés par les cellules de granulosa et thécales (Onagbesan *et al.*, 2003). BMP4 et 6 stimulent la production de P4 basale et induite par les hormones gonadotropes (Onagbesan *et al.*, 2003; Al-Musawi *et al.*, 2007). De plus, BMP6 et 7 stimule la prolifération des cellules de granulosa (Onagbesan *et al.*, 2003; Al-Musawi *et al.*, 2007) alors que BMP4 a un effet inhibiteur ou une absence d'effet sur la prolifération des cellules de granulosa selon le stade de différenciation du follicule (Onagbesan *et al.*, 2003; Elis *et al.*, 2007).

#### *e- L'AMH*

L'AMH intervient également dans la régulation de la croissance du follicule primordial (Durlinger *et al.*, 2002a). L'invalidation de ce gène chez la souris, entraîne une augmentation du recrutement de ces follicules primordiaux ayant pour conséquence une déplétion rapide de la réserve ovarienne (Durlinger *et al.*, 1999). D'autre part, le traitement des follicules pré-antraux de souris avec l'AMH entraîne une inhibition de la croissance folliculaire dépendante de la FSH (Durlinger *et al.*, 2002a; Durlinger *et al.*, 2002b; Visser *et al.*, 2005).

## **II-BMP4 : régulateur de la stéroïdogénèse lors du développement ovarien**



## **BMP4 : régulateur de la stéroïdogénèse lors du développement ovarien**

*La mention des figures en gras fait référence aux figures intégrées dans l'article.*

### **Résumé de l'étude :**

Comme développé précédemment (synthèse bibliographique chapitre V-2 p42), le développement gonadique chez le poulet est fortement influencé par la production de stéroïdes. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place de cette stéroïdogénèse est importante et en particulier la régulation de la production de l'œstradiol et de l'expression du gène codant pour l'aromatase (*CYP19A1*) qui sont spécifiques à l'ovaire.

Parmi les acteurs régulant cette stéroïdogénèse, les hormones gonadotropes et en particulier la FSH stimule les niveaux de sécrétion de testostérone (T4) et d'œstradiol (E2) (Teng *et al.*, 1982; Mendez-Herrera *et al.*, 1998; Pedernera *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 2001). Suite à l'étude précédente démontrant l'expression préférentielle des BMPs et de certains éléments de leur voie de signalisation dans l'ovaire et aux vues de leurs implications dans la régulation de la stéroïdogénèse basale ou stimulée par la FSH dans les cellules de granulosa des mammifères et des poules adultes (Knight *et al.*, 2006; Al-Musawi *et al.*, 2007; Elis *et al.*, 2007), nous avons émis l'hypothèse que ces BMPs pourraient réguler la stéroïdogénèse au cours de la différenciation gonadique chez le poulet.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des cultures organotypiques d'ovaires embryonnaires de poulet prélevés au jour 7 (moment du début de la différenciation histologique et de l'expression de l'aromatase) et au jour 9 (moment où le dimorphisme sexuel dans l'expression de BMP4 devient marqué). Ces cultures de « pool » de gonades ont été supplémentées avec de la FSH ovine (oFSH: 25 ng /ml) en présence ou non d'une protéine recombinante humaine de BMP4 (rhBMP4: 50ng/ml). Afin de mesurer les effets sur les niveaux de stéroïdes produits, les milieux de cultures ont été analysés après 48h et 96h de culture par des dosages hormonaux. D'autre part, en fin de culture (96h), l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (*STAR*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *HSD17B1* et *CYP19A1*) a été analysée par PCR en temps réel.

En accord avec les précédents travaux, nos résultats confirment que la FSH stimule la production de P4, T4 et E2 dans les ovaires cultivés aux jours 7 et 9 (**Figure 1**). De façon cohérente avec l'augmentation de la sécrétion de progestérone, il est observé une

augmentation de l'expression des gènes *STAR*, *CYP11A1* et *HSD3B1* (**Figure 2**). Néanmoins, l'augmentation de T4 et E2 a lieu sans augmentation des niveaux d'expression de *HSD17B1* et de *CYP19A1* ou de la protéine aromatasase (**Figure 3**).

Les effets de BMP4 sur la production de stéroïdes par les cultures d'ovaires sont plus variables selon le stade et le temps de culture. Si BMP4 ne modifie pas la sécrétion basale de P4, dans les ovaires de jour 9 cultivés pendant 96h, il diminue les niveaux induits par la FSH. De plus, dans les ovaires de jour 9, BMP4 inhibe les sécrétions basales de T4 et E2 sans modifier les effets de la FSH sur celles-ci. Malgré une absence d'effet observé sur la production basale de P4, BMP4 inhibe l'expression basale et induite par la FSH de *STAR* et l'expression basale de *CYP11A1*. D'autre part, l'inhibition des niveaux de T4 et E2 est cohérente avec une diminution de l'expression de *CYP17A1*, *HSD17B1* et *CYP19A1* (ARNm et protéine) (**Figures 2 et 3**)

## FSH and BMP4 present opposite regulatory effects on steroidogenesis during chicken ovarian differentiation

Carré G.<sup>1</sup>, Fabre S.<sup>1</sup>, Guibert E.<sup>1</sup>, Couty I.<sup>1</sup>, Alves S.<sup>1</sup> and Govoroun M.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Physiologie de la Reproduction et des Comportements UMR 6175, INRA, CNRS, Université F. Rabelais de Tours, Haras Nationaux, Nouzilly, France

<sup>2</sup> Corresponding author, Marina.Govoroun@tours.inra.fr

### Abstract:

During the chicken ovarian differentiation, steroid production plays a crucial role and in particular estrogens are essential for the development of the cortical region. Moreover, we have previously shown that several members of bone morphogenetic proteins (BMP) which are involved in the regulation of basal and FSH-induced steroidogenesis in mammals and hen granulosa cells are preferentially expressed in the ovary *compared* to the testis during chicken gonadal differentiation. In the aim to test the hypothesis that BMPs could also modulate steroidogenesis during gonadal development, we have developed day 7 and day 9 chicken ovaries cultures in the presence of FSH and BMP4 each alone or in combination. We confirmed by steroid assays the strongly stimulative effects of FSH on steroid production by cultured embryonic gonads through an upregulation of steroidogenic genes expression (determined by real-time PCR) and showed that the inhibitory effects of BMP4 on estradiol and FSH induced progesterone production are mediated through a downregulation of *STAR* and *CYP19A1* mRNA expression. These data suggest that BMP4 is an inhibitor of steroidogenesis during ovarian differentiation and could be necessary to maintain steroidogenesis on a physiological level in chicken embryonic ovaries.

### Introduction:

Chicken exhibits a ZW/ZZ mechanism of genotypic sex determination in which the female is heterogametic (ZW). The gonads develop at the surface of mesonephros by day 3 of incubation and remain bipotential until day 6.5. From day 6.5, gonads differentiate into testes or ovaries. Around this period, ovary begins to produce steroids (progesterone P4, testosterone T4 and estradiol E2) [1-7] which are measurable in plasma from day 7.5 [8-10]. The steroidogenesis is more active in chicken ovary than in testis [5]. Indeed, genes coding for steroidogenic

enzymes which convert cholesterol into androstenedione (*CYP11A1*, *HSD3B1* and *CYP17A1*) are expressed in male and female gonads as early as day 7 [11] while, *HSD17B1* and *CYP19A1*, involved in E2 production, are detected by *in situ* hybridization from day 7, only in female gonad [11]. The gonadal development is sensitive to exogenous hormonal manipulations. Actually, the disruption of estrogens synthesis after the inhibition of the aromatase activity in the ZW embryos leads to a female-to-male sex-reversal with the development of a right testis and a left testis or ovotestis [12-16]. Moreover, E2 treatment prior to the onset of gonadal

differentiation in the ZZ embryos, leads to a transient feminization of gonads [17]. So, the E2 production and *CYP19A1* mRNA expression are essential for ovarian development. Among factors known to be involved in steroidogenesis regulation during chicken gonadal differentiation, gonadotropins *i.e.* follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) have been shown to stimulate T4 and E2 production [18-22]. The  $\beta$  subunit of FSH has been detected from day 4.5 in the adenohypophysis of the chicken embryo [23] and the protein has been measured in plasma from day 8 with a maximal value at day 10 [24]. Furthermore, the *FSHR* (follicle stimulating hormone receptor) has been shown to be expressed in the chicken embryonic gonads from day 4, attesting their possible sensitivity to FSH stimulation [25]. Interestingly, we and others showed that several members of the bone morphogenetic proteins (BMP) family (BMP2, 3, 4 and 7) are preferentially expressed in the chicken ovary during gonadal differentiation [26] (article I). In mammals, BMP representing the largest subgroup within the transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) family, are involved in several processes of embryonic development as the establishment of left-right asymmetry, cellular proliferation, differentiation and survival [27, 28]. BMPs initiate intracellular signaling by interaction with heterotetramers of transmembranous receptors with serine/threonine kinase activity including two type 1 receptors (BMPRI1A, BMPRI1B or ACVRI1) and two type 2 receptors (BMPRI2, ACVRI2A or ACVRI2B) [29]. The ligand-binding activation of these receptors leads to the phosphorylation of downstream factors belonging to the MAD (mother against

decapentaplegic) family including receptor-specific SMAD1, 5, 8; associated thereafter with the common-partner SMAD4 to act as transcription factors or cofactors on target genes [30, 31]. In mammalian ovary, BMPs are involved in the follicular growth and maturation as well as in the regulation of ovulation quota [32, 33]. During these processes, one way of BMPs action is the regulation of basal and/or FSH induced steroid production. Similarly in the hen granulosa cells, we have shown that BMP15 and BMP4 inhibit the FSH induced P4 production. [34]. Based on these observations, we investigated the potential role of BMP signaling on basal and FSH induced steroidogenesis during chicken ovarian differentiation using human recombinant BMP4. To this aim, we have cultured embryonic ovaries explanted at day 7 (the onset of gonadal differentiation) and at day 9 (the onset of sexually dimorphic expression of BMP4) in the presence of BMP4 or FSH each alone or in combination, and we checked for steroid production in the culture media and expression of steroidogenic genes in the cultured ovarian explants.

## **Material and methods:**

### **Animals:**

Fertilized eggs of Isabrown hens were incubated at 37.8°C and 40% humidity. At day 7 or day 9, eggs were removed and embryos were dissected after decapitation. All procedures were approved by the Agricultural and Scientific Research agencies and conducted in accordance with the guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

### **Organ culture:**

For one independent culture condition, four left ovaries were dissected, pooled and placed onto a 8µm polycarbonate membrane (Nunc, Roskilde, Denmark) floating on 500µl of culture medium, according to stage (day 7 or day 9 of incubation) and sex (see below for the genetic sexing). Culture medium was DMEM with stable glutamine and without phenol-red (Promocell, Heildeberg, Germany) supplemented with bovine serum albumin (BSA, 3mg/ml), cholesterol (200ng/ml; water soluble powder) and ampicillin (50µg/ml) (all products from Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) [35]. The culture medium was supplemented or not with purified ovine FSH (25ng/ml) (oFSH, lot n°AFP-7028D; 4453 IU/mg; FSH activity=175 times the oFSH-S1 activity) and/or recombinant human BMP4 (50ng/ml) (rhBMP4, R&D systems Europe, Lille, France). After 48h in culture at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, media were replaced by fresh ones for 48 extra hours. Media collected at 48h and 96h of culture were stored at -20°C prior to hormonal assays. At 96h, ovaries were stored at -20°C prior to RNA and proteins extractions.

### **Genetic sexing:**

At the time of gonad dissection, small pieces of neck tissues were collected for genomic DNA extraction according to Etsoup's method [36]. Briefly, tissues were incubated for 2 hours at 55°C in 200µl of 10% Chelex100 resin (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and proteinase K (200mg/ml; Interchim; Montluçon, France). PCR sexing was performed with 2µl of genomic DNA with W (female)

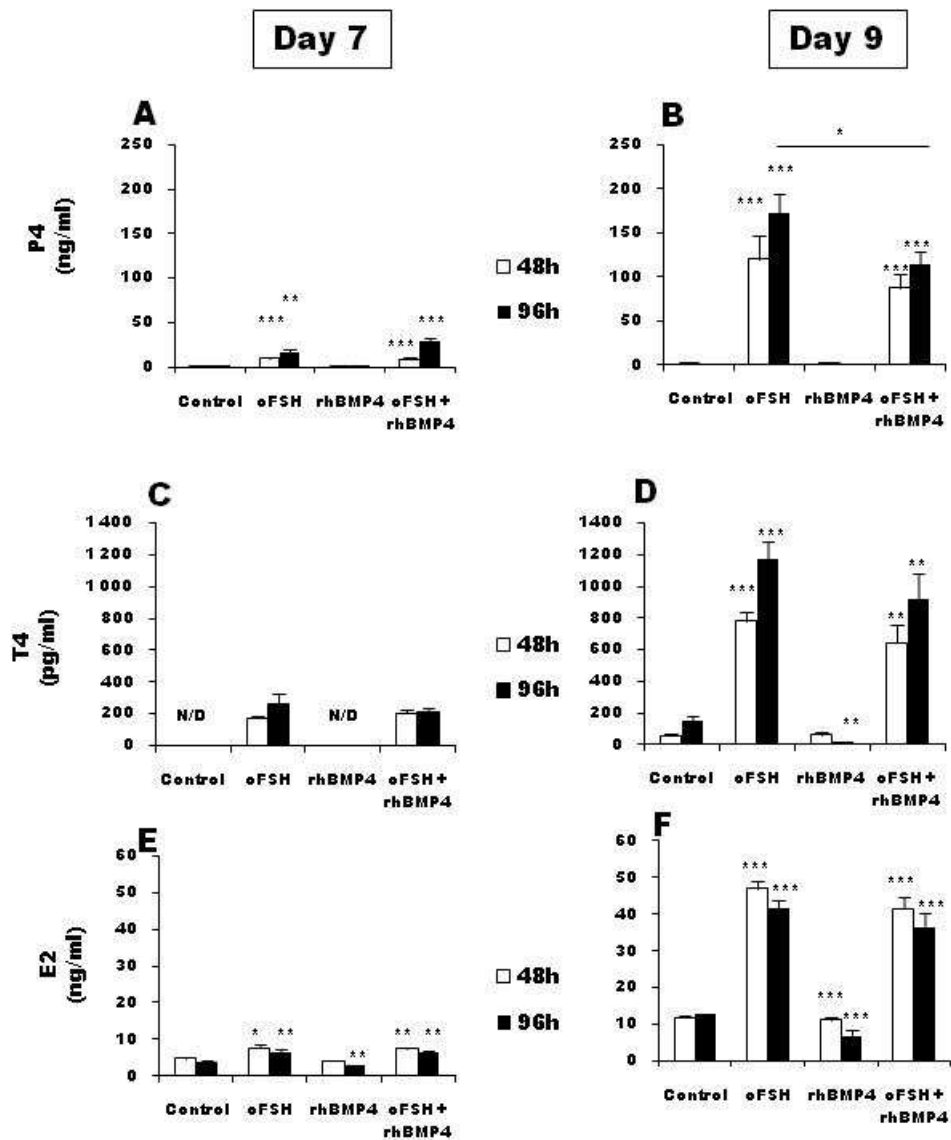
specific Xho1 primers and 18s RNA primers as previously described [37].

### **Steroid assays:**

P4, T4 and E2 concentrations were measured in each culture medium (50µL/assay). P4 and T4 were assayed by ELISA and RIA assays, respectively and as previously described [38, 39]. E2 was assayed by ELISA with estradiol-EASIA kit (DIAsources Imunnoassays, Nivelles, Belgium) following the manufacturer's instructions. The limits of detection were 40pg/ml for P4, 120pg/ml for T4 and 5pg/ml for E2.

### **Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction:**

Total RNA was extracted using Nucleospin RNA II kit (MachereyNagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. For cDNA analysis, 500ng to 1µg of total RNA was reverse transcribed with MMLV reverse transcriptase in the presence of oligodT (250ng), random hexamers (62.5ng), dNTP (0.5nM) and RNAsine (RNase inhibitor, 20U), all products purchased from Promega (Charbonnières, France). Quantitative real-time PCR (qPCR) was carried out on a Ligthcycler 480 (Roche diagnostics, Meylan, France). Reactions were performed in 10µl with 0.5µM of each primer, 5µl of 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France) and 2.5µl of cDNA sample in 96-well plates. For each set of primers (for primer sequences, annexes), efficiency curves were generated using serial dilutions of the same cDNA sample (pool of reverse-transcribed RNA samples) in abscissa and the corresponding cycle threshold (Ct) in



**Figure 1: effects of oFSH and rhBMP4 on steroid production by cultured embryonic chicken ovaries.**

P4 (A, B), T4 (C, D), E2 (E, F) concentrations, were measured in media of cultured ovaries explanted at day 7 (A, C, and E) or at day 9 (B, D, and F,) supplemented or not with oFSH and rhBMP4. White bars represent steroid concentration after 48h in culture and black bars represent steroid concentration after 96h. Data are represented as means  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant difference between tested treatment and control (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

ordinate. The slope of the log-linear phase reflects the amplification efficiency (E) derived from the formula  $E = e^{(-1/\text{slope})}$ . Melting-curve analysis was performed for each primer pair to check the purity of the PCR product. The relative amount of the target RNA (R) was then determined using the following equation  $R = E^{Ct_{ref}} / E^{Ct_{target}}$  where  $Ct_{target}$  is the cycle threshold of the gene of interest and  $Ct_{ref}$  is the cycle threshold of *EEF1A* gene which is used as internal reference gene.

### Western Blot analysis:

Frozen gonads were ground were sonicated in a buffer containing (20 mM Tris [pH 7.5], 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid and 1% triton) containing various protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, and 10 mg/ml aprotinin) and phosphatase inhibitors (100 mM sodium fluoride, 10 mM pyrophosphate, and 2 mM sodium orthovanadate (Sigma). Homogenates were quickly frozen in liquid nitrogen for 3 times and centrifuged at 13000g for 20 min at 4 °C and supernatants stored at -80°C. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad). Gonad lysates (40 µg of protein) were subjected to SDS-PAGE gel electrophoresis and Western blotting using the aromatase antibody (final dilution: 1/1000, AbD serotec; Colmar, France). After washing, membranes were incubated with an Alexa Fluor secondary antibody (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France). Bands were visualized by infrared fluorescence by the Odyssey® Imaging

System (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, Version 1.2).

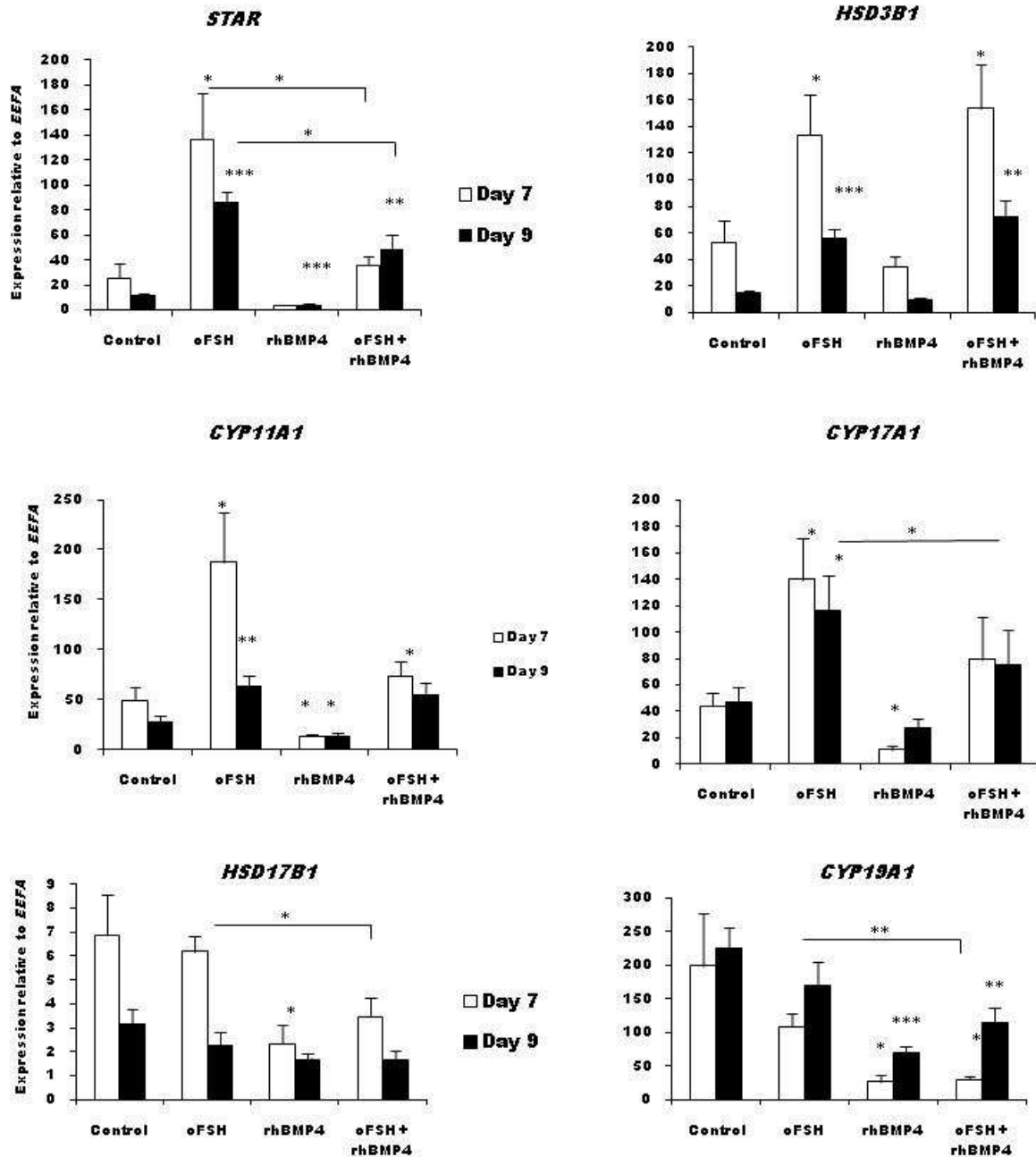
### Data analysis:

All experimental data are represented as means ± S.E.M. and analyzed by Welch's student test to assume for different variances. For all analyses, differences with  $p > 0.05$  were considered as not significant. A minimum of 6 ovarian pools was used for each treatment conditions (biological replicates) coming from 5 or 6 independent cultures

### Results:

#### Effects of oFSH and rhBMP4 on steroid production:

Steroid secretion by the ovaries explanted at day 7 corresponding to the onset of ovarian differentiation or day 9 corresponding to the onset of sexual dimorphism in *BMP4* expression pattern was measured after 48h and 96h of culture, in the presence of oFSH or rhBMP4 each alone or in combination. As shown in figure 1, the basal and FSH-dependent productions of P4, T4 and E2 were higher by day 9 than by day 7 cultured-ovaries, indicating an increase in the steroidogenic activity during these 2 days of *in vivo* development. Furthermore, between day-7 ovaries cultured for 96h and day-9 ovaries cultured for 48h, there was no significant difference in the P4 level but those of E2 levels were higher in the media of gonads explanted at day 9 and cultured for 48h ( $p < 0.001$ ).



**Figure 2: effects of oFSH and rhBMP4 on steroidogenic genes expression in cultured embryonic chicken ovaries.**

Total RNA from 96h cultured ovaries were reverse transcribed and submitted to qPCR analysis. Data are represented as means  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant difference between tested treatment and control (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ). White bars represent relative expression obtained on day 7 cultured ovaries and black bars represent relative expression obtained on day 9 cultured ovaries.



Ovine FSH alone showed a strong stimulatory effect on P4, T4 and E2 production by cultured ovaries of both studied stages. The effects of oFSH were higher on day 9 than on day 7 cultured ovaries for P4 and E2 production. Indeed, oFSH stimulated P4 production by about 40 fold by day 7 ovaries and by about 200 fold by day 9 ovaries after 96h of culture. In the same manner, oFSH increased E2 production by 1.6 fold and by 4 fold in day 7 and in day 9 cultured ovaries respectively. This indicates that the increased steroidogenic activity in day 9 ovaries is accompanied by a better sensitivity to FSH action compared to day 7. Nevertheless, this comparison cannot be obtained for T4 production due to basal T4 level below the sensitivity of the RIA dosage by day 7 cultures. Recombinant human BMP4 alone did not modify the basal production of P4 in cultured ovaries at both developmental stages. However, it inhibited E2 production by day 7 (96h) and by day 9 ovaries (48h and 96h) and T4 production by day 9 ovaries at 96h of culture. In combination with oFSH, rhBMP4 inhibited the FSH-dependent increase of P4 production by day 9 ovaries after 96h in culture (oFSH vs. oFSH and rhBMP4:  $p=0.0408$ ).

#### **Effects of oFSH and rhBMP4 on steroidogenic genes expressions:**

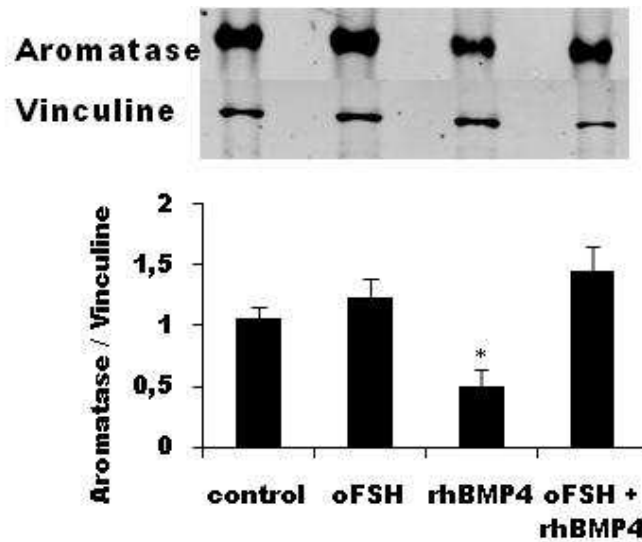
To better understand the effect of oFSH and rhBMP4 on steroid production, we have studied the expression of genes encoding proteins involved in steroidogenesis (*STAR*, *CYP11A1*, *HSD3B1*, *CYP17A1*, *HSD17B1* and *CYP19A1*) in left ovaries explanted at day 7 and day 9 and cultured for 96h (figure 2).

The treatment with oFSH increased the mRNA accumulation of *STAR*, *HSD3B1*, *CYP11A1* and *CYP17A1* genes in day 7 and day 9 cultured ovaries in accordance with P4 increased accumulation. However, oFSH was without effect neither on *HSD17B1* and *CYP19A1* mRNA expression (figure 2), nor on CYP19A1 protein level (figure 3) in discrepancy with an increase of E2 and T4 productions.

According to the inhibitory effects of rhBMP4 on T4 and E2 levels, it decreased significantly the expression of *CYP11A1* and *CYP19A1* at the both studied stages (figure 2) and decreased CYP19A1 protein level (figure 3). It also decreased *STAR* mRNA expression in day 9 cultured ovaries and *HSD17B1* and *CYP17A1* mRNA expression in day 7 cultured ovaries. However, rhBMP4 does not affect the *HSD3B1* mRNA expression. Furthermore, in the presence of oFSH, rhBMP4 decreased the FSH-dependent mRNA accumulation of *STAR* gene at both developmental stages and of *CYP17A1* gene in day 9 cultured ovaries.

#### **Effects of oFSH and rhBMP4 on the expression of steroidogenesis regulator genes:**

In order to improve knowledge on FSH and BMP mechanism of action on ovarian development, we have measured the effect of oFSH and rhBMP4 on the expression of *FSHR*, *NR5A1* and *FOXL2*, well known regulator genes of steroidogenesis [25, 40-43]. However, as shown in figure 4, neither oFSH nor rhBMP4 had any effect on the expression of these genes. But according to the increased sensitivity of day 9 ovaries to FSH, *FSHR* mRNA expression was higher



**Figure 3: effects of oFSH and rhBMP4 on aromatase protein level by cultured embryonic chicken ovaries.**

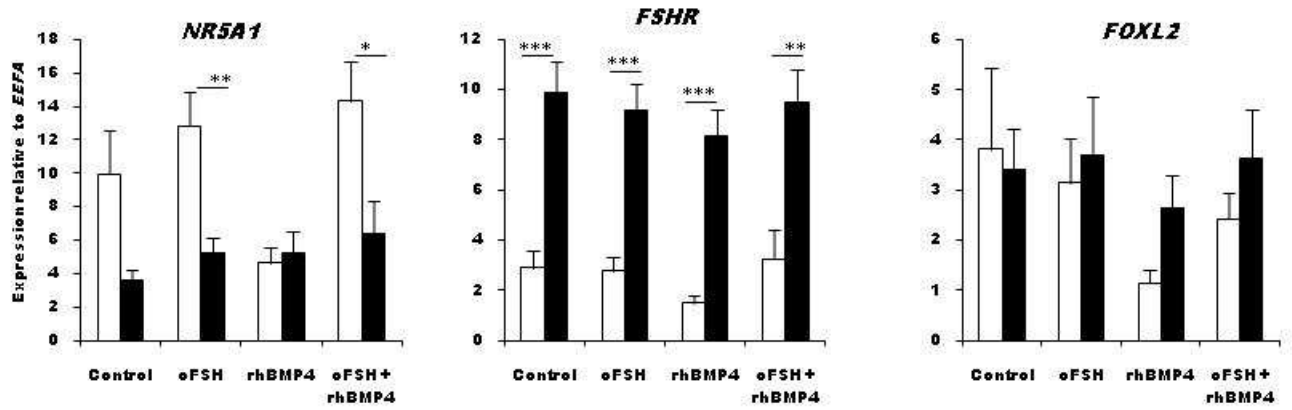
Proteins were extracted from day 9 ovaries cultured for 96h and analyzed by western-blot using an Aromatase antibody. Vinculine was used as gel loading control. Data are represented as means  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant difference between tested treatment and control (\*  $p < 0.05$ )

in the day 9 than in the day 7 cultured ovaries (figure 4).

### Discussion:

The developmental expression of different members of BMP family in the embryonic ovary has been described in several vertebrate species (human, mouse, sheep, chicken and trout) [44-47] (article I). However, their functions in embryonic ovaries remain largely unknown. The main studied function was their implication in the formation and proliferation of primordial germ cells [48-52]. They are also involved in the recruitment of resting primordial follicles into growing follicles, step which begins during fetal life in the most of mammalian species. For example, BMP4, 7 and 15 promote the primordial to primary follicle transition and enhance follicle survival [53-55]. In adult granulosa cells of mammals and hens, BMPs regulate ovarian function mainly by an action on basal and FSH stimulated steroid production [32-34, 56, 57]. Here, we have investigated the involvement of BMP4 on steroidogenesis regulation during chicken ovarian differentiation taking in account that BMP4 presented a sexually dimorphic expression in the embryonic ovary from day 9. In this aim, we used an organ culture of ovaries explanted at day 7 and day 9. These ovaries successfully survived and maintained differentiation as proved by the expression of ovarian markers (*CYP19A1* and *FOXL2*) and E2 secretion. However, the E2 level production in day 7 ovaries cultured for 96h (corresponding to a day 11 ovary) is lesser than the E2 level in day 9 ovaries cultured for 48h (also corresponding to a day 11 ovary) suggesting that ovarian differentiation *in vitro* was not as much efficient as *in vivo*.

Consistent with previous studies, our result confirmed that FSH increased T4 and E2 production [18-22]. To our knowledge, this is the first evidence of the strongly positive effect of FSH on P4 production by cultured chicken ovaries. The effect of FSH was stronger in day 9 than in day 7 cultured ovaries; possibly explained by the increase of *FSHR* mRNA accumulation (figure 4) [25] and then the FSH sensitivity during ovarian differentiation. Among the measured steroids, P4 was the most stimulated by FSH and this increased production was associated with an upregulation of *STAR*, *HSD3B1* and *CYP11A1* mRNA expression as early as day 7, consistent with previously showed highest activities of HSD3B1 and CYP11A1 enzymes in primary cell cultures of day 18 ovaries stimulated by FSH[19]. To our knowledge, the involvement of P4 during chicken ovarian differentiation has not been yet studied. We have previously showed that progesterone receptor (PR) increased during gonadal development without any sexual dimorphism (Article I) suggesting that embryonic gonads could be responsive to progesterone stimulation. P4 is known to promote cell survival in mammalian granulosa and luteal cells [58] and in a similar manner, blocking progesterone synthesis in quail granulosa cells led to an increase of apoptosis [59]. Furthermore, P4 regulates cells proliferation by an upregulation of cyclin D1 [60]. These data suggested that P4 could be involved in the cell proliferation and survival, during chicken ovarian differentiation. Surprisingly, FSH increased T4 and E2 production without any changes of the *HSD17B1* (coding enzyme which convert androstenedione into T4) or *CYP19A1* mRNA expression



**Figure 4: effects of oFSH and rhBMP4 on steroidogenesis regulators gene expression in cultured embryonic chicken ovaries.**

Total RNA from 96h cultured ovaries were reverse transcribed and submitted to qPCR analysis. Data are represented as means  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant difference between tested treatment and control (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ). White bars represent relative expression obtained on day 7 cultured ovaries and black bars represent relative expression obtained on day 9 cultured ovaries.

(coding enzyme which convert androgens into E2). So, these enzymes could be in a sufficient quantity to ensure a higher production by an increase of their steroid precursors or their activities are enhanced without modification of their expression as has been previously shown during oocyte development in the red sea bream [61]. Our results contrast with a previous study realized on primary cultures of day 18 chicken ovaries, showing that FSH induced a small upregulation of *CYP19A1* mRNA expression [19]. This discrepancy could be explained by a difference of sensitivity of used methods (qPCR vs. to classical RT-PCR) or by the fact that a day 18 ovary is more sensitive to FSH than a day 7 or day 9 ovary. In contrast to FSH positive effects, our study showed that BMP4 was globally an inhibitor of basal T4 and E2 secretion by ovaries without change in basal P4 production level, even if conclusion on the P4 basal secretion is limited due to very low level of this secretion..Associated with the inhibition of the steroid production, BMP4 decreased *STAR*, *CYP11A1*, *CYP17A1* and *CYP19A1* mRNA expression. This finding is consistent with BMP4 effects in ovine granulosa cell cultures, in which it decreased P4 synthesis by inhibiting *STAR* and *CYP11A1* mRNA expression without any effect on *HSD3B1* mRNA expression [62]. Furthermore, we showed that BMP4 limited the FSH effect on P4 production by a downregulation of FSH stimulated *STAR* mRNA expression; as has been already shown in mammals and hen granulosa cells [34, 62-64].. The inhibition of T4 secretion by the inhibition of *CYP17A1* mRNA expression was consistent with inhibitory effect of BMP4, 6 and 7 on basal and LH induced androgens production by bovine thecal cells [65] and by human ovarian

thecal-like tumor cell culture model [66]. Surprisingly in our study, BMP4 inhibited E2 secretion in chicken cultured ovaries. In fact, in mammalian granulosa cells BMPs either have no effect as in rat granulosa cells [63] or are stimulators of E2 production as in ruminant granulosa cells [67, 68]. This inhibition by BMP4 could be necessary to maintain E2 on a physiological level. Indeed, several studies showed that *in ovo* exposure of quail embryos to E2 or derivatives dose-dependently shortened the left oviduct, induced abnormal development of the right oviduct and uterus accompanied by a thinning or a lack of eggshell [69-71]. In order to better understand the mechanisms by which FSH or BMP4 affect the steroidogenesis regulation in chicken embryonic ovary, we have investigated the expression of *FSHR*, *FOXL2* and *NR5A1*. *NR5A1* coding for steroidogenic factor 1 (SF1) is involved in the regulation of expression of *STAR*, *HSD3B1* and *CYP11A1* in mammals [40, 41, 72, 73] and it is preferentially expressed in the ovary than in the testis during chicken gonadal differentiation [74]. In this study, neither FSH nor BMP4 did modify its expression in cultured ovaries. However, BMP4 could modulate its activity as previously showed in ovine granulosa cells, in which SMAD1 (BMP4 intracellular transducer) inhibits the NR5A1 transcriptional activity on the canonical NR5A1 responsive element [62]. Furthermore, *FOXL2* is a regulator of *CYP19A1* expression in mammals [42] and it is specifically expressed in chicken differentiating ovary [75]. But the inhibition of *CYP19A1* under BMP4 stimulation occurred in the absence of modulation of *FOXL2* mRNA expression. Furthermore, in adenohipophysectomised chicken at day 13.5, *FSHR* mRNA

expression decreased suggesting a regulation of this receptor by gonadotropins [76]. Here we showed that FSH had no effect on the expression of its own receptor. Moreover, in rat granulosa cells, BMP15 and BMP6 have been shown to inhibit FSH stimulated P4 production by a downregulation of the *FSHR* mRNA expression and by inhibition of adenylate cyclase activity [64]. While chicken *FSHR* promoter contains SMAD response element [77], BMP4 did not alter its expression. The absence of effect on the *FSHR* mRNA expression under BMP4 stimulations was similar to what has been observed in ovine granulosa cells in which BMP4 inhibited FSH induced P4 production without modification of *FSHR* mRNA expression [62].

To conclude, this study confirms the involvement of FSH in the regulation of steroidogenesis during chicken ovarian differentiation and shows for the first time the inhibitory effect of BMP4 on this steroidogenesis. Thus, BMP4, preferentially expressed in the chicken embryonic ovary, is not a factor that promotes ovarian differentiation for which E2 production is essential but, it could be necessary to maintain steroidogenesis on a physiological level.

## References:

1. Weniger JP, Zeis A. [Biosynthesis of estrogens by chick gonadal rudiments]. *Gen Comp Endocrinol* 1971; 16: 391-395.
2. Galli F, Wassermann GF. Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 1972; 19: 509-514.
3. Galli FE, Wassermann GF. Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 1973; 21: 77-83.
4. Guichard A, Cedard L, Haffen K. [Comparative aspect of the synthesis of sex steroids by chick embryonic gonads at different stages of development (study in organ culture in the presence of radioactive precursors)]. *Gen Comp Endocrinol* 1973; 20: 16-28.
5. Guichard A, Cedard L, Mignot TM, Scheib D, Haffen K. Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: differences according to age, sex, and side. *Gen Comp Endocrinol* 1977; 32: 255-265.
6. Guichard A, Cedard L, Mignot TM, Scheib D, Haffen K. Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroid precursors. *Gen Comp Endocrinol* 1979; 39: 9-19.
7. Guichard A, Scheib D, Haffen K, Cedard L. Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture. *J Steroid Biochem* 1977; 8: 599-602.
8. Woods JE, Brazzill DM. Plasma 17 beta-estradiol levels in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1981; 44: 37-43.
9. Woods JE, Congoran DD, Thomes RC. Plasma estrone levels in the chick embryo. *Poult Sci* 1982; 61: 1729-1733.
10. Tanabe Y, Saito N, Nakamura T. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 1986; 63: 456-463.
11. Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T, Mizuno S. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J Mol Endocrinol* 1998; 20: 193-202.
12. Abinawanto, Shimada K, Yoshida K, Saito N. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450 (17 alpha) and P450 arom messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen Comp Endocrinol* 1996; 102: 241-246.

13. Burke WH, Henry MH. Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. *Poult Sci* 1999; 78: 1019-1033.
14. Elbrecht A, Smith RG. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 1992; 255: 467-470.
15. Vaillant S, Magre S, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N. Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Dev Dyn* 2001; 222: 228-237.
16. Wartenberg H, Lenz E, Schweikert HU. Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo. *Andrologia* 1992; 24: 1-6.
17. Scheib D. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* 1983; 23 Suppl: S87-92.
18. Pedernera E, Solis L, Peralta I, Velazquez PN. Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development. *Gen Comp Endocrinol* 1999; 116: 213-220.
19. Gomez Y, Velazquez PN, Peralta-Delgado I, Mendez MC, Vilchis F, Juarez-Oropeza MA, Pedernera E. Follicle-stimulating hormone regulates steroidogenic enzymes in cultured cells of the chick embryo ovary. *Gen Comp Endocrinol* 2001; 121: 305-315.
20. Velazquez PN, Peralta I, Pedernera E. Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 105: 40-49.
21. Teng CT, Teng CS, Bousfield GR, Liu WK, Ward DN. Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen Comp Endocrinol* 1982; 48: 325-332.
22. Mendez-Herrera MC, Tamez L, Candido A, Reyes-Esparza JA, Pedernera E. Follicle stimulating hormone increases somatic and germ cell number in the ovary during chick embryo development. *Gen Comp Endocrinol* 1998; 111: 207-215.
23. Woods JE, Hopkins W. E., Caliendo J, Sorentino M.J., Martens J.B., and Thommes R.C. Ontogenesis of LHRH in the hypothalamus and LH and FSH in the pars distalis of the chick embryo. In: Lofts and Holmes E (ed.) *Current Trends in Comparative Endocrinology*. Hong Kong: Hong Kong Univ.Press; 1985: pp. 131-134.
24. Rombauts L, Berghman LR, Vanmontfort D, Decuypere E, Verhoeven G. Changes in immunoreactive FSH and inhibin in developing chicken embryos and the effects of estradiol and the aromatase inhibitor R76713. *Biol Reprod* 1993; 49: 549-554.
25. Akazome Y, Abe T, Mori T. Differentiation of chicken gonad as an endocrine organ: expression of LH receptor, FSH receptor, cytochrome P450c17 and aromatase genes. *Reproduction* 2002; 123: 721-728.
26. Hoshino A, Koide M, Ono T, Yasugi S. Sex-specific and left-right asymmetric expression pattern of Bmp7 in the gonad of normal and sex-reversed chicken embryos. *Dev Growth Differ* 2005; 47: 65-74.
27. Kishigami S, Mishina Y. BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 265-278.
28. Kishigami S, Yoshikawa S, Castranio T, Okazaki K, Furuta Y, Mishina Y. BMP signaling through ACVRI is required for left-right patterning in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2004; 276: 185-193.
29. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010; 147: 35-51.
30. Zeng S, Chen J, Shen H. Controlling of bone morphogenetic protein signaling. *Cell Signal* 2001; 22: 888-893.

31. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 2783-2810.
32. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132: 191-206.
33. Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, Monget P, Monniaux D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4: 20.
34. Elis S, Dupont J, Couty I, Persani L, Govoroun M, Blesbois E, Batellier F, Monget P. Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary. *J Endocrinol* 2007; 194: 485-497.
35. Jordanov J, Angelova P. Effects of steroid sex hormones on chick embryo gonads in organ culture, with special reference to hormonal control of gonadal sex differentiation. *Reprod Nutr Dev* 1984; 24: 221-233.
36. Etsoup A PE, Chourrout D. Rapid one-tube DNA extraction for reliable detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1996; 5: 295-298.
37. Clinton M, Haines L, Belloir B, McBride D. Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. *Br Poult Sci* 2001; 42: 134-138.
38. Canépa SL, A.L. Bluteau, A. Fagu, C, Flon C. and Monniaux D. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cah. Techn. INRA* 2008; 64: 19-30.
39. Hochereau-de Reviers MT, Perreau C, Pisselet C, Fontaine I, Monet-Kuntz C. Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov rams. *Domest Anim Endocrinol* 1990; 7: 63-73.
40. Liu Z, Simpson ER. Steroidogenic factor 1 (SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 127-137.
41. Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF, 3rd. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 1996; 35: 9052-9059.
42. Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol* 2006; 36: 399-413.
43. Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJ. Forkhead 12 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* 2004; 145: 3424-3433.
44. Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod* 2005; 73: 959-966.
45. Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P, Parker KL, Vassalli JD. Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol* 2005; 287: 361-377.
46. Mandon-Pepin B, Oustry-Vaiman A, Vigier B, Piumi F, Crihiu E, Cotinot C. Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. *Biol Reprod* 2003; 68: 985-995.
47. Abir R, Ben-Haroush A, Melamed N, Felz C, Krissi H, Fisch B. Expression of bone morphogenetic proteins 4 and 7 and their receptors IA, IB, and II in human ovaries from fetuses and adults. *Fertil Steril* 2008; 89: 1430-1440.
48. Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4



and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7858-7862.

49. Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 2001; 232: 484-492.

50. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13: 424-436.

51. Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1053-1063.

52. Ross A, Munger S, Capel B. Bmp7 regulates germ cell proliferation in mouse fetal gonads. *Sex Dev* 2007; 1: 127-137.

53. Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 2001; 65: 994-999.

54. McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MP. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction* 2005; 129: 481-487.

55. Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 2003; 69: 1265-1272.

56. Al-Musawi SL, Gladwell RT, Knight PG. Bone morphogenetic protein-6 enhances gonadotrophin-dependent progesterone and inhibin secretion and expression of mRNA transcripts encoding gonadotrophin receptors and inhibin/activin subunits in chicken granulosa cells. *Reproduction* 2007; 134: 293-306.

57. Onagbesan O, Bruggeman V, Decuypere E. Intra-ovarian growth factors regulating ovarian function in avian species: a review. *Anim Reprod Sci* 2009; 111: 121-140.

58. Makrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Montas S, Coutifaris C. Progesterone is an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell survival in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900: 16-25.

59. Mussche S, D'Herde K. Contribution of progesterone, follicle stimulating hormone and glucocorticoids in survival of serum-free cultured granulosa cell explants. *J Endocrinol* 2001; 169: 321-331.

60. Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 2008; 73: 922-928.

61. Gen K, Okuzawa K, Kumakura N, Yamaguchi S, Kagawa H. Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biol Reprod* 2001; 65: 1186-1194.

62. Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Mandon-Pepin B, Monniaux D, Monget P, Fabre S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 805-817.

63. Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem* 2001; 276: 32889-32895.

64. Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 11387-11392.

65. Glister C, Richards SL, Knight PG. Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology* 2005; 146: 1883-1892.
66. Dooley CA, Attia GR, Rainey WE, Moore DR, Carr BR. Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3331-3337.
67. Glister C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 2004; 127: 239-254.
68. Souza CJ, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* 2002; 123: 363-369.
69. Kamata R, Takahashi S, Shimizu A, Morita M, Shiraishi F. In ovo exposure quail assay for risk assessment of endocrine disrupting chemicals. *Arch Toxicol* 2006; 80: 857-867.
70. Halldin K, Berg C, Bergman A, Brandt I, Brunstrom B. Distribution of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in quail eggs, embryos and laying birds and studies on reproduction variables in adults following in ovo exposure. *Arch Toxicol* 2001; 75: 597-603.
71. Halldin K, Holm L, Ridderstrale Y, Brunstrom B. Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in ovo exposure to o,p'-DDT. *Arch Toxicol* 2003; 77: 116-122.
72. Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Kallen CB, Strauss JF, 3rd. Multiple steroidogenic factor 1 binding elements in the human steroidogenic acute regulatory protein gene 5'-flanking region are required for maximal promoter activity and cyclic AMP responsiveness. *Biochemistry* 1997; 36: 7249-7255.
73. Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH. Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem* 1997; 272: 7960-7967.
74. Smith CA, Smith MJ, Sinclair AH. Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 1999; 113: 187-196.
75. Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I, Batellier F, Cotinot C. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev Dyn* 2004; 231: 859-870.
76. Sanchez-Bringas G, Salazar O, Pedernera E, Mendez C. Follicle-stimulating hormone treatment reverses the effect of hypophysectomy on cell proliferation in the chicken embryo ovary. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 149: 134-140.
77. Johnson AL, Woods DC. Dynamics of avian ovarian follicle development: cellular mechanisms of granulosa cell differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 2009; 163: 12-17.

## Discussion et perspectives :

Cette étude confirme le rôle de la FSH dans la régulation de la stéroïdogénèse dans l'ovaire embryonnaire de poulet avec pour la première fois une mesure directe des effets de la FSH sur la production de progestérone. De plus, jusqu'à présent, les expériences réalisées sur des cultures dissociées d'ovaires embryonnaires avaient démontré une augmentation de l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse (Gomez *et al.*, 2001). Ici, nous montrons que cette augmentation d'activité peut être en partie la conséquence d'une stimulation de l'expression des gènes codant pour ces enzymes. Cependant, l'aromatase échappe à cette observation car si la FSH stimule la production d'œstradiol, l'expression de *CYP19A1* et de l'aromatase reste inchangée. Ceci peut s'expliquer d'une part par l'hypothèse que l'aromatase est exprimée en excès et que la seule augmentation de ses substrats est suffisante pour induire une augmentation de la production d'œstrogènes ou s'expliquer par le fait que l'activité de l'enzyme est stimulée sans effet sur son niveau d'expression. De même, la FSH pourrait stimuler la sécrétion d'œstradiol sans modifier les niveaux de production et nous envisageons de mesurer les niveaux d'œstradiol intra-ovarien pour tester cette hypothèse.

Cette étude suggère également que comme dans les cellules de granulosa adultes des mammifères ou de la poule, les BMPs sont des régulateurs de la stéroïdogénèse à un niveau basal comme après stimulation par la FSH. Les résultats observés sur l'ovaire en développement sont similaires aux effets de BMP15, dans les cellules de granulosa adultes où BMP15 inhibe la production basale de la progestérone par les follicules pré-ovulatoires F1 et inhibe les effets de la FSH sur cette sécrétion de progestérone par les follicules hiérarchiques de F6 à F1 (Elis *et al.*, 2007). Cependant, dans les cellules de granulosa de poules adultes, BMP4 et BMP7 stimulent la synthèse de progestérone (Onagbesan *et al.*, 2003).

De plus, dans les cellules de granulosa de rat, les BMPs n'ont pas d'effet sur la production basale de progestérone mais module l'action de la FSH par une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase et par une inhibition de l'expression du récepteur *FSHR* (Otsuka *et al.*, 2001a; Otsuka *et al.*, 2001b) tandis que dans les cellules de granulosa de brebis l'effet inhibiteur de BMP4 sur la production basale et induite par la FSH a lieu sans modification de l'expression de *FSHR* (Pierre *et al.*, 2004). Ainsi, les effets observés dans l'ovaire embryonnaire de poulet sont similaires à ceux observés chez la brebis où BMP4 est inhibiteur de la production basale de P4 par l'inhibition de l'expression des gènes *STAR* et *CYP11A1* sans affecter l'expression de *HSD3B1*.

Au cours du développement gonadique, BMP4 peut exercer une action indépendante de la FSH et les effets observés suggèrent une action qui comme chez la brebis serait en aval de la synthèse de l'AMPc (Pierre *et al.*, 2004). Néanmoins, Il serait dès lors intéressant d'étudier les effets de BMP4 sur l'activité de l'adénylate cyclase induite par la FSH.

De plus, dans ces cultures organotypiques nous avons montré l'action inhibitrice de BMP4 sur l'expression de *CYP19A1* et de la protéine aromatasase induisant une diminution de la sécrétion d'œstradiol. Chez la poule adulte, les analyses des effets des BMPs ont été réalisées sur des cultures de cellules de granulosa qui ne produisent pas d'œstradiol (production assurée par les cellules thécales); dès lors aucune mesure des effets sur cette synthèse n'a été réalisée. Cependant, ces résultats s'opposent aux observations faites chez les mammifères où les BMPs s'ils ont des effets sont des potentialisateurs de la sécrétion d'œstradiol. En effet, chez les bovins et les ovins, BMP2 stimule la synthèse d'œstradiol par les cellules de granulosa (Souza *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2006) tandis que BMP6 ne modifie pas cette production d'œstradiol. Cependant, GDF9 (facteur ovocytaire et membre de la famille des TGF $\beta$ ) inhibe les effets de la FSH sur l'expression de *CYP19A1* suggérant un rôle d'inhibition de la production d'estrogènes. Ainsi, *BMP4* qui est plus exprimé dans la gonade femelle en différenciation n'a pas un rôle de potentialisateur de l'expression de *CYP19A1* et de l'aromatase étape majeure de la différenciation de l'ovaire mais serait un modulateur de la stéroïdogénèse et pourrait intervenir dans le maintien de celle-ci à un niveau physiologique.

Suite à ce travail, nous avons investigué le rôle de BMP4 au cours de la différenciation testiculaire afin de déterminer si les BMPs peuvent avoir les mêmes actions dans un environnement où la stéroïdogénèse est moins active. De plus, comme BMP4 n'est pas un facteur promouvant la synthèse des œstrogènes, nous avons recherché s'il pouvait être un facteur anti-testiculaire et avons étudié ses effets sur l'expression de « marqueurs testiculaires » que sont *AMH* et *SOX9*.

### **III- BMP4 : régulateur de la stéroïdogénèse et de l'expression de l'*AMH* lors du développement testiculaire**

## **BMP4 : régulateur de la stéroïdogénèse et de l'expression de l'AMH lors du développement testiculaire**

*La mention des figures en gras fait référence aux figures intégrées dans l'article.*

### **Résumé de l'étude :**

Comme lors de la différenciation de l'ovaire, le testicule embryonnaire de poulet exprime les enzymes de la stéroïdogénèse (*STAR*, *HSD3B1*, *CYP11A1*, *CYP17A1* et *HSD17B1*) engendrant la production de progestérone et de testostérone qui sont détectées dans le plasma des embryons de poulet dès le jour 7.5. Néanmoins, en absence d'expression de l'aromatase, le testicule ne synthétise pas les œstrogènes. Cependant, si cette production de stéroïdes est réelle, les niveaux produits restent inférieurs à ceux observés chez la femelle. De façon similaire à la gonade femelle, la stéroïdogénèse dans la gonade mâle est régulée positivement par les gonadotropines FSH et LH malgré une plus faible expression de leurs récepteurs (*FSHR* et *LHR*).

Afin de tester l'implication des BMPs dans la régulation de la stéroïdogénèse par le testicule embryonnaire, nous avons développé des cultures organotypiques de testicules gauches traités avec de la FSH ovine (oFSH: 25ng/ml) et/ou une protéine recombinante humaine (rhBMP4: 50ng/ml). Les niveaux de stéroïdes produits ont été mesurés dans les milieux de cultures après 48h et 96h de culture par des dosages hormonaux. D'autre part, en fin de culture (96h), l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse a été analysée par PCR en temps réel. De plus, il a été également étudié par PCR en temps-réel les effets de ces molécules sur les marqueurs de la différenciation testiculaires que sont l'*AMH* et *SOX9*.

En accord avec les précédentes études, la FSH augmente la sécrétion de testostérone et de progestérone par les testicules embryonnaires aux jours 7 et 9. Ainsi, même si l'expression du récepteur à la FSH est plus faible dans la gonade mâle que dans la gonade femelle, ces testicules sont sensibles aux gonadotropines et cela de façon aussi précoce. Cette stimulation des stéroïdes s'accompagne d'une stimulation de l'expression des gènes *STAR*, *HSD3B1* et dans une moindre mesure de *CYP11A1* et *CYP17A1* (**Figures 1 et 2**).

Aux jours 7 et 9, BMP4 inhibe la production basale et stimulée par la FSH de la progestérone. De plus, au jour 7, BMP4 inhibe les effets de la FSH sur la production de testostérone tandis qu'au jour 9, cet effet est visible mais n'est pas statistiquement significatif

De façon cohérente avec l'effet sur la progestérone, BMP4 inhibe l'expression basale et induite par la FSH de *STAR*. D'autre part, BMP4 inhibe l'expression de *HSD3B1* et *CYP11A1* dans les testicules au jour 9 ; suggérant que la sensibilité aux BMPs augmente au cours du développement testiculaire. D'autre part, BMP4 inhibe l'expression basale et induite par la FSH de *CYP17A1* ; renforçant l'idée que BMP4 inhibe les effets de la FSH sur la production de testostérone même si cette inhibition n'est pas statistiquement significative au jour 9 (**Figures 1 et 2**).

De façon intéressante, la FSH ainsi que BMP4 induisent une inhibition de l'expression du gène codant pour l'*AMH*. De plus la FSH diminue également l'expression de *SOX9* dans le testicule embryonnaire au jour 9. Nous avons également mesuré l'expression de ces deux gènes dans des cultures d'ovaires embryonnaires aux jours 7 et 9. Si la FSH inhibe également l'expression de l'*AMH* dans les gonades femelles au jour 9, BMP4 ne modifie pas cette expression. D'autre part, ni la FSH ni BMP4 n'ont d'effet sur l'expression de *SOX9*. Cependant, l'expression de *SOX9* est spécifique du testicule, dès lors les niveaux d'expression relative mesurés dans la gonade femelle sont proches du bruit de fond et ne permettent pas la détection d'un effet inhibiteur (**Figure 3**).

## **FSH and BMP4 are modulators of the steroidogenesis and inhibitors of *AMH* expression during chicken testicular differentiation.**

Carré G.<sup>1</sup>, Fabre S.<sup>1</sup>, Guibert E.<sup>1</sup>, Couty I.<sup>1</sup> and Govoroun M.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Physiologie de la Reproduction et des Comportements UMR 6175, INRA, CNRS, Université F. Rabelais de Tours, Haras Nationaux, Nouzilly, France

<sup>2</sup> Corresponding author, Marina.Govoroun@tours.inra.fr

### **Abstract:**

In chicken, the steroidogenesis which begins early and during gonadal development, is more active in the ovary and is essential for differentiation. Gonadotropins (luteinising hormone, LH and follicle stimulating factor, FSH) are well known regulators of this steroid production. Furthermore, bone morphogenetic protein 4 which is more expressed in embryonic ovaries than in testes, is an inhibitor of basal and FSH-induced progesterone and estradiol production. The present study aimed to investigate the effect of this factor alone or in combination with FSH on the steroidogenesis in male gonads using organotypic cultures of testes explanted at day 7 and day 9. The findings show that BMP4 presents an inhibitory effect on basal and FSH induced progesterone and FSH induced testosterone secretions through a downregulation of steroidogenic gene expression. Furthermore, FSH and BMP4 downregulate the expression of *AMH* and *SOX9* genes. Because these two genes are essential for testis differentiation, it is proposed that BMP4 could be an anti-testicular factor.

### **Introduction:**

In chicken, the determinism of sex is genetic with a ZZ/ZW chromosomes system where the female is heterogametic (ZW). Gonadal organogenesis begins around day 3 of incubation with the thickening of the coelomic epithelium on the mesonephros surface and is characterized by a bipotential period until day 6.5. From this time, testes and ovaries begin to be histologically distinguishable. If in birds, the major determining factor equivalent of mammalian *SRY* has not been yet identified, several genes have been shown to be involved in the differentiation of the testis (*DMRT1*, *AMH*, *SOX9*...) or of the ovary (*CYP19A1*, *FOXL2*, *RSPO1*...) [1-8]. Furthermore, experiments with

exogenous hormones showed that chicken gonadal differentiation is sensitive to steroids. Indeed, the *in ovo* treatment of ZZ embryos with estrogens induces a transient male to female sex reversal [9] while the inhibition of estrogen synthesis leads to a female to male sex reversal [10-14]. These studies highlight that estrogens play a crucial role during ovarian development. The steroidogenesis begins early during chicken gonadal development since gonads already produce steroids (Progesterone (P4) and Testosterone (T4)) at the time of gonadal differentiation while only ovary produce estradiol (E2) [15-22]. These steroids are measured in plasma of day 7.5 embryos [22-24]. The steroid production is the consequence of the expression of genes coding for steroidogenic enzymes



(*HSD3B1*, *CYP11A1* and *CYP17A1*) in the gonads of both sexes as early as day 7 [10, 25, 26]. However, only ovary expresses *CYP19A1* which encodes aromatase, enzyme involved in the conversion of androgens to estrogens [5, 10, 26]. Gonadotropins are involved in the regulation of steroidogenesis in chicken embryonic gonads and in particularly stimulate T4 and E2 production [27-31]. Previously, we showed that BMP4 (bone morphogenetic protein) which is preferentially expressed in chicken embryonic ovaries exerts an inhibitory effect on basal E2 and FSH-induced P4 production by cultured ovaries through the downregulation of steroidogenic enzymes genes, in particularly *STAR* and *CYP19A1* (Carré et al., Article I et II). The present study aimed to investigate the effects of BMP4 on basal and FSH-induced steroid synthesis during chicken testicular differentiation. Using organotypic cultures of testes explanted at day 7 (corresponding to the onset of gonadal differentiation) and day 9 (corresponding to the onset of the sexually dimorphic expression of *BMP4*), and cultured in presence of rhBMP4 or oFSH each alone or in combination, we checked the steroid production in the culture media (steroid assays) and the expression of steroidogenic (genes real-time PCR) in the cultured testes explants. Furthermore, we have studied the effects of rhBMP4 and oFSH on the expression of two testicular genes *AMH* and *SOX9*.

## Material and methods:

### Animals:

Fertilized eggs of Isabrown hens were incubated at 37.8°C and 40% humidity. At day 7 or day 9, eggs were removed and embryos were dissected after

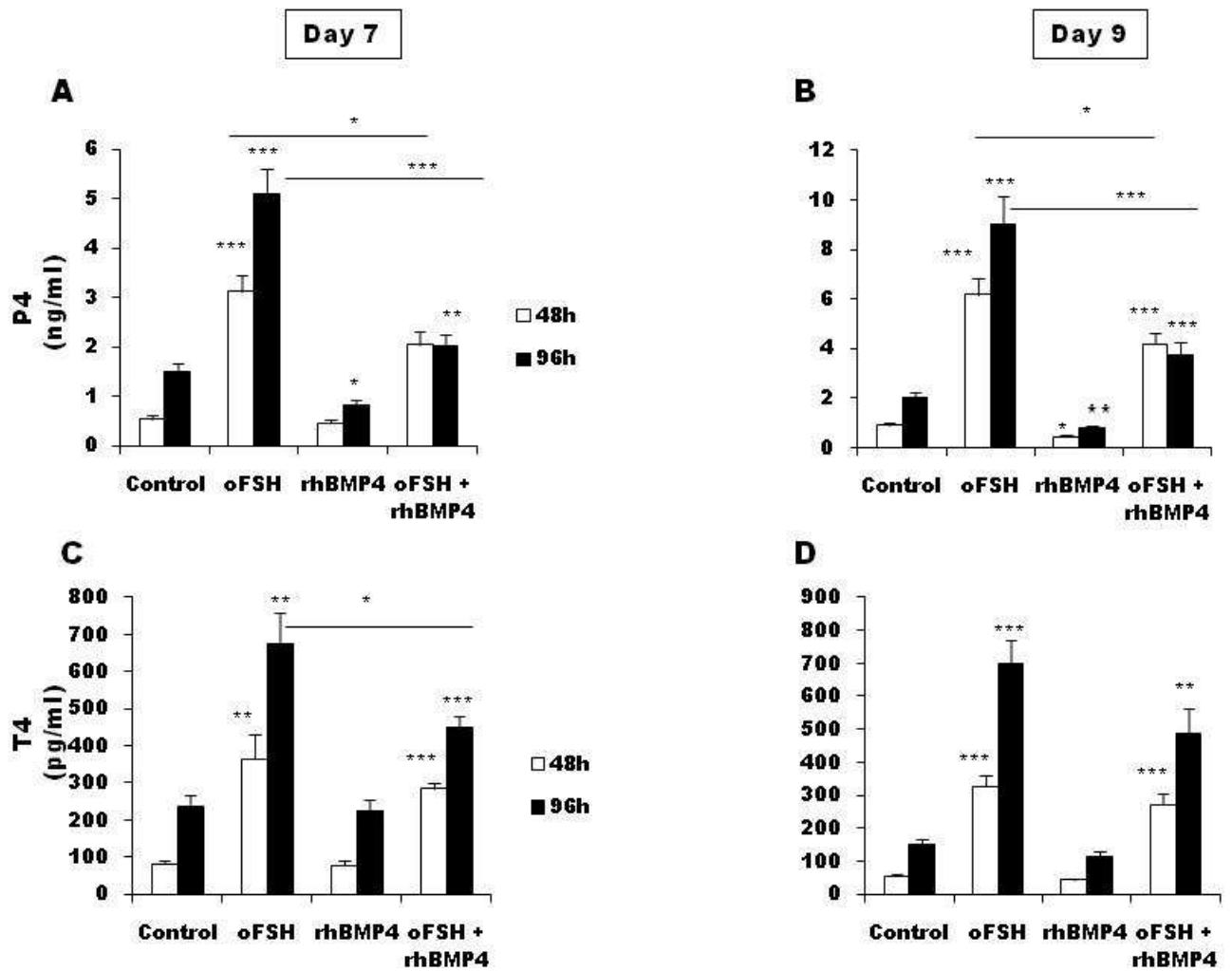
decapitation. All procedures were approved by the Agricultural and Scientific Research agencies and conducted in accordance with the guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

### Organ culture:

For one independent culture condition, four left ovaries or testes were dissected, pooled and placed onto a 8µm polycarbonate membrane (Nunc, Roskilde, Denmark) floating on 500µl of culture medium, according to stage (day 7 or day 9 of incubation) and sex (see below for the genetic sexing). Culture medium was DMEM with stable glutamine and without phenol-red (Promocell, Heildeberg, Germany) supplemented with bovine serum albumin (BSA, 3mg/ml), cholesterol (200ng/ml; water soluble powder) and ampicillin (50µg/ml) (all products from Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) [32]. The culture medium was supplemented or not with purified ovine FSH (25ng/ml) (oFSH, lot n°AFP-7028D; 4453 IU/mg; FSH activity=175 times the oFSH-S1 activity) and/or recombinant human BMP4 (50ng/ml) (rhBMP4, R&D systems Europe, Lille, France). After 48h of culture at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, media were replaced by fresh ones for 48 extra hours. Media collected at 48h and 96h of culture were stored at -20°C prior to steroid assays. At 96h, ovaries were stored at -20°C prior to RNA extractions.

### Genetic sexing of chicken embryos:

At the time of gonad dissection, small pieces of neck tissues were collected for genomic DNA extraction according to



**Figure 1:** Effects of oFSH and rhBMP4 on steroid production by cultured embryonic chicken testes:

Left testes were explanted at day 7 or day 9 and cultured for 96h with or without oFSH (25ng/ml) in the absence or the presence of rhBMP4 (50ng/ml). Results are represented as means  $\pm$  S.E.M. Asterisks represent significant difference between treatment tested and control (Welch's student test: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). A) Progesterone levels in 7-days-old testes after 48h (white bars) and 96h (black bars) in culture (ng/ml of medium). B) Progesterone levels in 9-days-old testes after 48h (white bars) and 96h (black bars) in culture (ng/ml of medium). C) Testosterone levels in 7-days-old testes after 48h (white bars) and 96h (black bars) in culture (pg/ml of medium). D) Testosterone levels in 9-days-old testes after 48h (white bars) and 96h (black bars) in culture (pg/ml of medium)

Etsoup's method [33]. Briefly, tissues were incubated for 2 hours at 55°C in 200µl of 10% Chelex100 resin (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and proteinase K (200mg/ml; Interchim; Montluçon, France). PCR sexing was performed with 2µl of genomic DNA with W (female) specific Xho1 primers and 18s RNA primers as previously described [34].

### **Hormonal assays:**

P4 and T4 concentrations were measured in each culture medium (50µL/assay). P4 and T4 were assayed by ELISA and RIA assays respectively and as previously described [35, 36]. The limits of detection were 0.4ng/ml for P4 and 0.12ng/ml.

### **Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (qPCR):**

Total RNA was extracted using Nucleospin RNA II kit (MachereyNagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. For cDNA analysis, 500ng to 1µg of total RNA was reverse transcribed with MMLV reverse transcriptase in the presence of oligodT (250ng), random hexamers (62.5ng), dNTP (0.5nM) and RNAsine (RNase inhibitor, 20U), all products purchased from Promega (Charbonnières, France). Quantitative real-time PCR (qPCR) was carried out on a Ligthcycler 480 (Roche diagnostics, Meylan, France). Reactions were performed in 10µl with 0.5µM of each primer, 5µl of 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France) and 2.5µl of cDNA sample in 96-well plates. For each set of primers (for primer sequences, see "annexes"), efficiency curves were generated using serial dilutions of the same

cDNA sample (pool of reverse-transcribed RNA samples) in abscissa and the corresponding cycle threshold (Ct) in ordinate. The slope of the log-linear phase reflects the amplification efficiency (E) derived from the formula  $E = e^{(-1/slope)}$ . Melting-curve analysis was performed for each primer pair to check the purity of the PCR product. The relative amount of the target RNA (R) was then determined using the following equation  $R = E^{Ct_{ref}} / E^{Ct_{target}}$  where Ct target is the cycle threshold of the gene of interest and Ct ref is the cycle threshold of *EEF1A* gene which is used as internal reference gene.

### **Data analysis:**

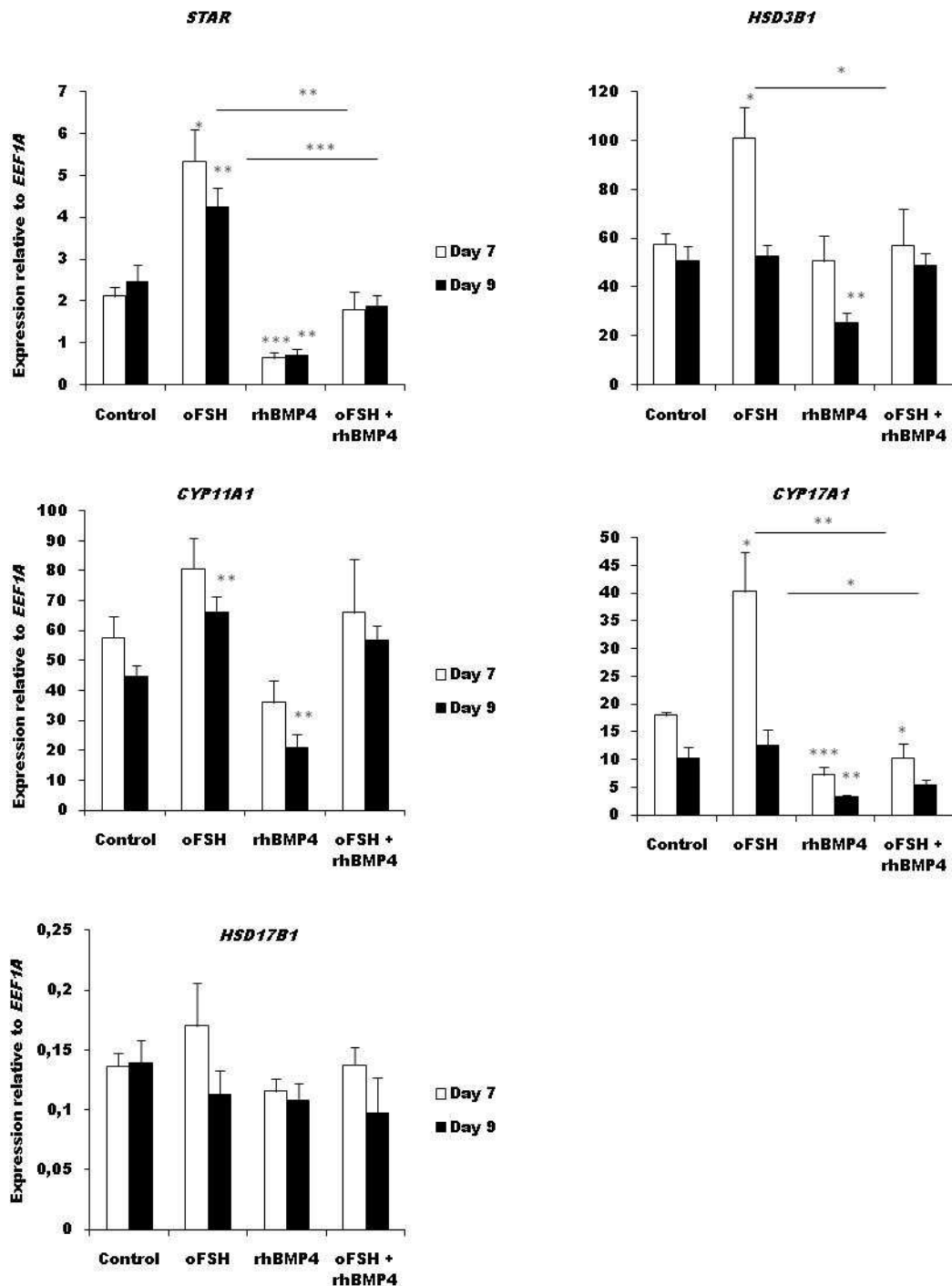
All experimental data are represented as means ± S.E.M. and analyzed by Welch's student test to assume for different variances. For all analyses, differences with  $p > 0.05$  were considered as not significant. A minimum of 5 gonads pools was used for each treatment conditions (biological replicates) coming from 5 or 6 independent cultures.

## **Results:**

### **Effects of oFSH and rhBMP4 on steroid production by cultured testes:**

To investigate, the involvement of oFSH and rhBMP4 on steroidogenesis, concentrations of P4 and T4 produced between 0 and 48h and between 48 and 96h were measured in the media of day 7 and day 9 cultured testes (Figure 1).

Surprisingly, the basal production of P4 and T4 by day 9 testes cultured for 48h was lower than that by day 7 testes cultured for 96h ( $p=0.0215$  and  $p=0.0015$



**Figure 2:** Effects of oFSH and rhBMP4 on steroidogenic enzymes gene expression in 7-day or 9-day-old cultured embryonic chicken testes.

Total RNA from 96h cultured ovaries were reverse transcribed and submitted to real-time RT-PCR analysis. Data are the mean  $\pm$  SEM of interest gene expression relative to that of the reference gene *EEF1A*. Asterisks represent significant difference between tested treatment and control (Welch's student test: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

respectively). As expected oFSH increased P4 and T4 production by day 7 as well as day 9 cultured testes. And these increases seem to be higher in day 9 cultured testes. For example, oFSH increased the P4 levels by 5.7 fold and by 7 fold in the media of day 7 and day 9 testes cultured for 48h respectively. Furthermore, rhBMP4 decreased basal P4 secretion by day 7 testes Cultured for 96h and by day 9 testes cultured for 48h and 96h. In contrast to this effect of rhBMP4 shown on P4 basal levels, basal T4 levels were not different from those found under rhBMP4. Interestingly, rhBMP4 also decreased oFSH induced P4 levels in the media of day 7 and day 9 cultured testes and decreased oFSH induced T4 levels in the media of day 7 testes 96h

#### **Effects of oFSH and rhBMP4 on steroidogenic enzymes genes expression in cultured testes:**

To better understand, the effects of oFSH and rhBMP4 on P4 and T4 production, we have measured by qPCR the expression of genes coding for proteins involved in the steroidogenesis (*STAR*, *CYP11A1*, *HSD3B1*, *CYP17A1* and *HSD17B1*) in day 7 and day 9 cultured testes (Figure 2).

Consistent with its effects on P4 and T4 secretion, oFSH increased *STAR* mRNA expression in day 7 and day 9 cultured testes. Moreover, oFSH upregulated *HSD3B1* and *CYP17A1* mRNA expression in day 7 cultured testes and *CYP11A1* mRNA expression in day 9 cultured testes. rhBMP4 treatment led to a decrease of basal and FSH induced *STAR*

and *CYP11A1* mRNA levels in day 7 and day 9 cultured testes. rhBMP4 also downregulated *HSD3B1* and *CYP17A1* mRNA expression at both studied developmental stages.

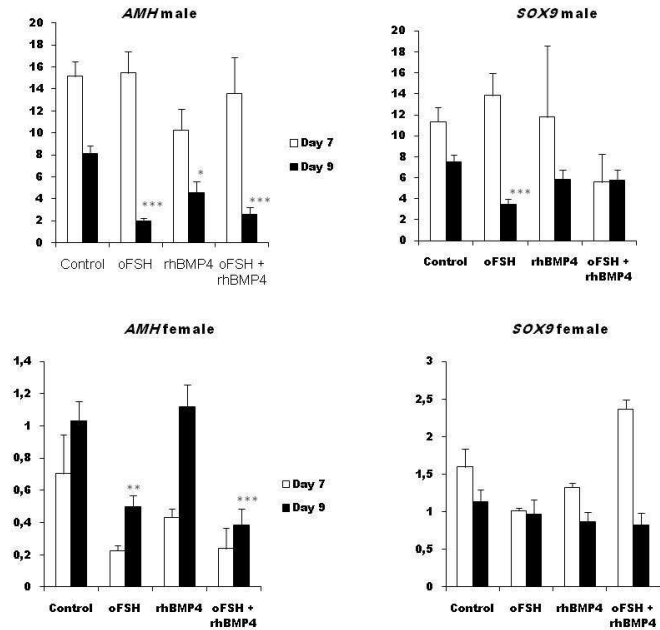
#### **Effects of oFSH and rhBMP4 on testicular markers genes expression in cultured testes and ovaries:**

In the aim to investigate the oFSH and rhBMP4 effects on the testis differentiation pathway, we have measured the expression of two testicular markers genes (*AMH* and *SOX9*) by qPCR in day 7 and day 9 cultured testes (illustrated in figure 3).

The treatment with oFSH led to an inhibition of *SOX9* and *AMH* mRNA expression in day 9 cultured testes without any effect in day 7 cultured testes. Furthermore, it also decreased the *AMH* mRNA expression in day 9 cultured ovaries without affecting that of *SOX9*. Moreover, rhBMP4 decreased *AMH* mRNA expression in day 9 cultured testes, but any effect was observed on its expression in cultured ovaries. The treatment with rhBMP4 had no effect on *SOX9* mRNA expression neither in day 7 nor in day 9 cultured ovaries and testes.

#### **Discussion:**

Gonadotropins are well known regulators of steroidogenesis in testes and ovaries during chicken gonadal differentiation [27-30, 37, 38] (Carré et al., Article D). Consistent with these results, we showed that FSH increased T4 and P4 productions by cultured testes as early as day 7. The effects of FSH on steroid



**Figure 3:** Effects of oFSH and rhBMP4 on testicular marker gene expression in 7-day or 9-day-old cultured embryonic chicken testes and ovaries.

Total RNA from 96h cultured ovaries were reverse transcribed and submitted to real-time RT-PCR analysis. Data are the mean  $\pm$  SEM of AMH or SOX9 expressions relative to that of the reference gene *EEF1A*. Asterisks represent significant difference between tested treatment and control (Welch's student test: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

production are mainly mediated by an upregulation of *STAR* mRNA expression; coding for the protein involved in the transfer of cholesterol into steroid making mitochondria [39].

However, the oFSH effects on the other steroidogenic gene expression were less obvious. Indeed, oFSH upregulates *CYP11A1* mRNA expression in day 9 cultured testes and *HSD3B1* mRNA expression in day 7 cultured testes only. Moreover, higher T4 level under oFSH stimulation was consistent with an upregulation of *CYP17A1* mRNA expression coding for the enzyme which converts P4 into androstenedione. FSH stimulatory effects on P4 and T4 productions found in this study were less powerful and those on steroidogenic gene expression less obvious in the testes compared to those found previously in cultured ovaries in which all these genes were upregulated after FSH stimulation (Carré et al., Article II). This observation confirms the fact that embryonic testes are less sensitive to FSH than ovaries due to a lesser expression level of the *FSH receptor* in the testes compared to that in the ovaries during chicken gonadal differentiation [25, 40]. In addition, weak mRNA expression levels determined by qPCR for some of these steroidogenic genes generate higher data variability that could mask FSH effect in cultured testes. In previous studies, we have shown that several members of BMP family were more expressed in the ovary than in the testis during chicken gonadal differentiation (Carré et al., Article I) and that BMP4 has inhibitory effect on T4 and E2 basal secretion and FSH induced P4 secretion by cultured differentiating ovaries (Carré et al., Article II). In the present study we show that as in cultured

ovaries, BMP4 decreases basal and FSH induced P4 secretion and FSH induced T4 secretion in cultured testes. These effects seem to be the consequences of a downregulation of *STAR* and *CYP17A1* mRNA expression in basal and FSH induced conditions and a downregulation of *HSD3B1* and *CYP11A1* mRNA expression in basal conditions only. The absence of the effect on T4 level under downregulation of *CYP17A1* mRNA by rhBMP4 treatment observed in this study could be due to the fact that BMP4 effect is not sufficiently strong and could be masked by the accumulation of this steroid in the media.

During chicken gonadal development, *AMH* is preferentially and *SOX9* is exclusively expressed in the developing testes [3, 4, 41, 42]. So, we have investigated the expression of these genes under FSH or/and BMP4 stimulations. FSH decreases the *AMH* mRNA expression in day 9 cultured testes and ovaries. The lack of oFSH effect in day 7 cultured testes could be explained by the too weak expression of *FSHR* [25, 40], whereas in day 7 cultured ovaries, oFSH effect could be masked by high variability in qPCR measures due to the too weak expression of *AMH* mRNA. These findings contrast with those obtained in mammalian adult testes, where FSH stimulated *AMH* expression and secretion by an increase of Sertoli cells proliferation and through an upregulation of transcriptional activity of *AMH* promoter [43-45]. Furthermore, the decrease of serum *AMH* observed during pubertal development in mice coincides with the increase of intratesticular T4 concentrations suggesting a downregulation of *AMH* by androgens [46].

Moreover, prepubertal *Tfm* mice, which are insensitive to androgens due to a mutation in the androgens receptor (AR), present a higher FSH-induced AMH expression than control confirming the involvement of androgens in AMH downregulation [43]. Thus, in our model, the downregulation of AMH by FSH could be the consequence of the increase of T4 secretion by this gonadotropin. This hypothesis could be envisaged because chicken embryonic ovaries and testes both express *AR* [47]. However the *AR* expression level is lower in embryonic testes compared to embryonic ovaries [47], which could lead to the lowest sensitivity of testes to androgens allowing a higher AMH expression in the testes compared to the ovaries.

Interestingly, in day 9 cultured testes, similar to the downregulation of *AMH* mRNA expression, oFSH downregulated *SOX9* mRNA expression. However, if in mammals *SOX9* is a well-known regulator of *AMH* mRNA expression [48, 49], this regulation has not been proved in chicken embryonic testes, although chicken *AMH* promoter contains *SOX* responsive element [3, 42, 50]. Thus, the downregulation of *AMH* by FSH could be due to the downregulation of the *SOX9* expression. This inhibitory effect of FSH on *SOX9* expression was not found in the embryonic ovaries despite of the fact that the downregulation of AMH expression by FSH was detected in day 9 cultured ovaries. However the levels of *SOX9* detected by qPCR in these ovaries were close to the background and did not allow the detection of any inhibition. This is in accordance with the in situ hybridization experiments reported previously, in which *SOX9* expression in chicken embryonic

ovaries have not been detected [4]; Interestingly, BMP4 also inhibited the *AMH* expression in day 9 cultured testes; suggesting that the lower level of BMPs in testes compared to that in ovaries could be necessary to avoid an inhibition of a crucial factor for chicken testicular differentiation.

To conclude, FSH and BMP4 have opposite effects on steroidogenesis during chicken gonadal differentiation but both are inhibitors of a major testicular gene which is AMH.

### References:

1. Smith CA, Katz M, Sinclair AH. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol Reprod* 2003; 68: 560-570.
2. Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 2009; 461: 267-271.
3. Eusebe D, di Clemente N, Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N, Picard JY. Cloning and expression of the chick anti-Mullerian hormone gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 4798-4804.
4. Oreal E, Mazaud S, Picard JY, Magre S, Carre-Eusebe D. Different patterns of anti-Mullerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Dev Dyn* 2002; 225: 221-232.
5. Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T, Mizuno S. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J Mol Endocrinol* 1998; 20: 193-202.
6. Smith CA, Shoemaker CM, Roeszler KN, Queen J, Crews D, Sinclair AH. Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 72.
7. Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I, Batellier F, Cotinot C. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev Dyn* 2004; 231: 859-870.
8. Loffler KA, Zarkower D, Koopman P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome:



FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 2003; 144: 3237-3243.

9. Scheib D. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* 1983; 23 Suppl: S87-92.

10. Abinawanto, Shimada K, Yoshida K, Saito N. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450 (17 alpha) and P450 arom messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen Comp Endocrinol* 1996; 102: 241-246.

11. Burke WH, Henry MH. Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. *Poult Sci* 1999; 78: 1019-1033.

12. Elbrecht A, Smith RG. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 1992; 255: 467-470.

13. Vaillant S, Guemene D, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N, Brillard JP. Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (*Gallus domesticus*) treated with Fadrozole. *Mol Reprod Dev* 2003; 65: 420-428.

14. Vaillant S, Magre S, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N. Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Dev Dyn* 2001; 222: 228-237.

15. Weniger JP, Chouraqui J, Zeis A. [Hypophysis and estradiol secretion in the chick embryo]. *C R Acad Sci III* 1989; 308: 531-536.

16. Galli F, Wassermann GF. Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 1972; 19: 509-514.

17. Galli FE, Wassermann GF. Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 1973; 21: 77-83.

18. Guichard A, Cedard L, Haffen K. [Comparative aspect of the synthesis of sex steroids by chick embryonal gonads at different stages of development (study in organ culture in the presence of radioactive precursors)]. *Gen Comp Endocrinol* 1973; 20: 16-28.

19. Guichard A, Cedard L, Mignot TM, Scheib D, Haffen K. Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: differences according to age, sex, and side. *Gen Comp Endocrinol* 1977; 32: 255-265.

20. Guichard A, Cedard L, Mignot TM, Scheib D, Haffen K. Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the

presence of some exogenous steroid precursors. *Gen Comp Endocrinol* 1979; 39: 9-19.

21. Guichard A, Scheib D, Haffen K, Cedard L. Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture. *J Steroid Biochem* 1977; 8: 599-602.

22. Tanabe Y, Saito N, Nakamura T. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 1986; 63: 456-463.

23. Woods JE, Brazzill DM. Plasma 17 beta-estradiol levels in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1981; 44: 37-43.

24. Woods JE, Congoran DD, Thomes RC. Plasma estrone levels in the chick embryo. *Poult Sci* 1982; 61: 1729-1733.

25. Akazome Y, Abe T, Mori T. Differentiation of chicken gonad as an endocrine organ: expression of LH receptor, FSH receptor, cytochrome P450c17 and aromatase genes. *Reproduction* 2002; 123: 721-728.

26. Nishikimi H, Kansaku N, Saito N, Usami M, Ohno Y, Shimada K. Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 20-30.

27. Pedernera E, Solis L, Peralta I, Velazquez PN. Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development. *Gen Comp Endocrinol* 1999; 116: 213-220.

28. Gomez Y, Velazquez PN, Peralta-Delgado I, Mendez MC, Vilchis F, Juarez-Oropeza MA, Pedernera E. Follicle-stimulating hormone regulates steroidogenic enzymes in cultured cells of the chick embryo ovary. *Gen Comp Endocrinol* 2001; 121: 305-315.

29. Velazquez PN, Peralta I, Pedernera E. Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 105: 40-49.

30. Teng CT, Teng CS, Bousfield GR, Liu WK, Ward DN. Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen Comp Endocrinol* 1982; 48: 325-332.

31. Mendez-Herrera MC, Tamez L, Candido A, Reyes-Esparza JA, Pedernera E. Follicle stimulating hormone increases somatic and germ cell number in the ovary during chick embryo development. *Gen Comp Endocrinol* 1998; 111: 207-215.

32. Jordanov J, Angelova P. Effects of steroid sex hormones on chick embryo gonads in organ culture, with special reference to hormonal control of gonadal sex differentiation. *Reprod Nutr Dev* 1984; 24: 221-233.

33. Etsoup A PE, Chourrout D. Rapid one-tube DNA extraction for reliable detection of fish

polymorphic markers and transgenes. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1996; 5: 295-298.

34. Clinton M, Haines L, Belloir B, McBride D. Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. *Br Poult Sci* 2001; 42: 134-138.

35. Hochereau-de Reviere MT, Perreau C, Pisselet C, Fontaine I, Monet-Kuntz C. Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov rams. *Domest Anim Endocrinol* 1990; 7: 63-73.

36. Canépa SL, A.L. Bluteau, A. Fagu, C, Flon C. and Monniaux D. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cah. Techn. INRA* 2008; 64: 19-30.

37. Peralta I, Romano MC, Velazquez PN. Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone on cultured chick embryo testis cells. *Poult Sci* 2004; 83: 1193-1198.

38. Peralta I, Romano MC, Velazquez PN. Signaling pathways involved in the effect of follicle-stimulating hormone on chick embryo testis cell proliferation. *Poult Sci* 2009; 88: 380-386.

39. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995; 267: 1828-1831.

40. Grzegorzewska AK, Sechman A, Paczoska-Eliasiewicz HE, Rzasca J. The expression of pituitary FSHbeta and LHbeta mRNA and gonadal FSH and LH receptor mRNA in the chicken embryo. *Reprod Biol* 2009; 9: 253-269.

41. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 1996; 14: 62-68.

42. Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D, Magre S. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn* 1998; 212: 522-532.

43. Al-Attar L, Noel K, Dutertre M, Belville C, Forest MG, Burgoyne PS, Josso N, Rey R. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Mullerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest* 1997; 100: 1335-1343.

44. Young J, Rey R, Schaison G, Chanson P. Hypogonadotropic hypogonadism as a model of post-natal testicular anti-Mullerian hormone secretion in humans. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211: 51-54.

45. Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarras P, Kumar TR, Dutertre M, Matzuk MM, Picard JY, Josso N, Rey R. Follicle-stimulating hormone increases testicular Anti-Mullerian hormone (AMH) production through sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-

monophosphate-mediated activation of the AMH Gene. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 550-561.

46. Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL, Josso N. Anti-mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1220-1226.

47. Katoh H, Ogino Y, Yamada G. Cloning and expression analysis of androgen receptor gene in chicken embryogenesis. *FEBS Lett* 2006; 580: 1607-1615.

48. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6653-6665.

49. Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 1999; 99: 409-419.

50. Takada S, Mano H, Koopman P. Regulation of *Amh* during sex determination in chickens: *Sox* gene expression in male and female gonads. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2140-2146.

## Discussion et perspectives :

Cette étude met en évidence un potentiel rôle inhibiteur de la FSH et de BMP4 sur l'expression du gène de l'*AMH* au jour 9, hormone indispensable au développement testiculaire et dont l'expression marque le début de la mise en place de l'organisation spécifique de la gonade mâle. Néanmoins, dans les gonades femelles au jour 9, si FSH inhibe également l'expression de l'*AMH*, BMP4 n'a pas d'effet. Ainsi, les effets observés chez le mâle peuvent ne pas être un effet spécifique aux BMPs puisque les BMPs et les Activines utilisent des récepteurs communs. Afin de tester cette hypothèse, des cultures organotypiques pourraient être réalisées et traitées avec d'autres membres des BMPs ou de l'activine afin de déterminer le rôle de ce facteur dont les sous-unités sont plus exprimées dans le testicule embryonnaire de poulet (Article I).

En parallèle de l'inhibition de l'*AMH*, la FSH inhibe également l'expression de *SOX9*. Malgré le fait que le début de l'expression de *SOX9* dans la gonade mâle soit postérieur à celui de l'*AMH*, indiquant que *SOX9* ne peut être l'inducteur de l'expression de l'*AMH*; il n'est pas exclu que *SOX9* puisse ultérieurement comme chez les mammifères réguler l'expression de l'*AMH* puisque des éléments de liaisons aux SOX sont retrouvés dans la séquence régulatrice de son promoteur chez le poulet. Dès lors, les effets de la FSH sur l'*AMH* peuvent être médiés par une inhibition de l'expression de *SOX9*.

D'autre part, chez les mammifères, il est supposé que les androgènes inhibent la sécrétion de l'*AMH* (Rey *et al.*, 1993). Or la FSH stimule la production de testostérone par les gonades embryonnaires, dès lors via cette stimulation de synthèse de la testostérone, il induirait l'inhibition de l'expression de l'*AMH*. Afin de tester cette hypothèse, nous envisageons de réaliser des cultures organotypiques des gonades de poulet en présence de testostérone. D'autre part, cette hypothèse est envisageable car les gonades mâles présentent une expression plus faible du récepteur aux androgènes et de FSHR. Dans ces conditions, dans la gonade mâle, les effets inhibiteurs de la FSH seraient limités laissant la possibilité de l'expression du gène majeur de la différenciation testiculaire qu'est l'*AMH*.

De plus, ces résultats suggèrent que si BMP4 n'est pas indispensable au développement ovarien, son expression limitée dans la gonade mâle est nécessaire pour une pleine expression de l'*AMH*.

# Discussion générale

## I- Partie I : Etude des profils d'expression de 110 gènes au cours de la différenciation gonadique chez le poulet

Au cours de la première partie de ce travail de thèse, nous avons étudié les profils d'expression de 110 gènes au cours de la différenciation gonadique dans les gonades gauche et droite chez le mâle et chez la femelle par PCR en temps réel. L'analyse de ces résultats nous a permis d'identifier de nouveaux gènes qui pourraient être impliqués dans la mise en place du testicule comme par exemple *NIMI* ou encore *ADAMTS12*. L'étude de ces deux gènes candidats sera poursuivie au sein du laboratoire par une recherche de leurs expressions dans le testicule de souris afin de déterminer s'ils sont conservés au cours de l'évolution et d'autre part, ils font l'objet d'une étude phylogénique en collaboration avec G.Pascal. De plus, ce travail a permis de montrer que les éléments de la superfamille du TGF $\beta$  présentaient des expressions sexuellement dimorphiques avec une expression préférentielle du système Activine/Inhibine dans le testicule et certains membres des BMPs dans l'ovaire. Cette étude est la première qui démontre l'expression au sein de la gonade embryonnaire de poulet de certains des récepteurs et de certains effecteurs intracellulaires (les SMADs) de cette famille ; suggérant qu'au cours de la différenciation gonadique embryonnaire, la voie de signalisation des TGF $\beta$  serait fonctionnelle.

Néanmoins, une des limites de cette approche réside dans le choix a priori des gènes étudiés; sélectionnés pour la majorité d'entre eux pour leur implication dans la différenciation gonadique d'autres espèces de vertébrés. De plus, si certains gènes semblent présenter une expression asymétrique, seuls deux gènes (*DDX4* et *PITX2*) présentant une expression préférentielle dans la gonade gauche sont communs aux gonades des deux sexes. Or lors de la mise en place de l'asymétrie, les gènes impliqués dans ces mécanismes sont exprimés de manière asymétrique dans les gonades des deux sexes (cf. chapitre V-1, p38). Afin de parfaire cette recherche de gènes candidats et en particulier de gènes impliqués dans la régulation de l'expression de *SOX9* et de *FOXL2* ou encore de *CYP19A1*, et de faciliter l'identification de ces nouveaux facteurs ainsi que ceux impliqués dans les mécanismes de l'asymétrie ; l'utilisation de puces à ADN pangénomique Affimetrix ou Agilent ou une puce à EST AGENAE-chick (avec 46% des séquences issues de tissus reproducteur) (Hérault, 2005) pourrait être envisagée.

De plus, les récents travaux sur la régulation post transcriptionnelle de l'expression des gènes montrent l'implication des microARNs dans la régulation de la croissance et la différenciation

cellulaire ainsi que dans l'apoptose. Ces petits ARN s'associent aux protéines argonautes dans le complexe RISC (RNA induced silencing complex) entraînant la répression de la traduction en se liant par complémentarité aux régions 3' non traduites des ARN cibles (Hammond *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001). Les mécanismes de répression par le complexe RISC sont variables : il peut agir en recrutant la machinerie de déadénylation ou d'enlèvement de la coiffe qui vont déstabiliser les ARNm mais il peut également séquestrer les ARNm dans le cytoplasme ou perturber la liaison des facteurs d'initiation ou d'élongation de la traduction (Rehwinkel *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Pillai *et al.*, 2007). Bannister *et al.* ont récemment mis en évidence l'expression sexuellement dimorphique de certains microARNs et présente un exemple de miRNA dont l'expression est préférentielle dans la gonade embryonnaire mâle de poulet par rapport à la gonade femelle (Bannister *et al.*, 2009). Dès lors, il est possible d'envisager l'existence de microARNs pouvant inhiber l'expression de *CYP19A1* ou de *FOXL2* dans la gonade mâle ou inhibant *SOX9* dans la gonade femelle ; ouvrant de nouvelles perspectives dans les mécanismes des régulations géniques impliqués dans la mise en place de la gonade. De même, l'action des BMPs au cours du développement gonadique pourrait être régulée par ces microARNs. En effet, au cours de la différenciation des cellules souches du foie, il a été identifié un microRNA (miRNA-23b) dont les cibles potentielles pourraient être les SMADs 3, 4 et 5 régulant ainsi la signalisation des TGF $\beta$  lors de la mise en place du canal biliaire (Rogler *et al.*, 2009) et de façon similaire un autre microRNA (miRNA-208) limite l'action de BMP2 sur la différenciation des préostéoblastes chez la souris (Itoh *et al.*, 2010). Le développement récent de puces à miRNA permettrait d'identifier les miRNA dont l'expression diffère entre la gonade mâle et femelle de poulet.

D'autre part, si l'implication de la stéroïdogénèse dans la différenciation gonadique est pleinement démontrée, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas complètement élucidés. Afin d'identifier, les gènes dont l'expression est régulée par les œstrogènes, nous envisageons de réaliser des études de comparaison du transcriptome de gonades femelles avec des gonades d'individus génétiquement mâle mais dont le sexe phénotypique est « inversé » par traitement avec des œstrogènes et des gonades d'individus génétiquement femelle mais dont le sexe phénotypique est « inversé » suite à l'inhibition de l'aromatase.

## II-Partie II : Etude des implications de BMP4 et de la FSH au cours de la différenciation gonadique chez le poulet

### 1- Régulation de la stéroïdogénèse

#### a- Les effets de la FSH

Nos travaux confirment que l'activité stéroïdogénique est plus importante dans l'ovaire embryonnaire de poulet et qu'elle augmente au cours du développement tandis que celle-ci reste plus constante dans les testicules entre les jours 7 et 9. Nos travaux confirment également le rôle des gonadotropines et en particulier de la FSH dans la régulation de la stéroïdogénèse dans la gonade embryonnaire de poulet avec une voie de signalisation qui est fonctionnelle dès le début de la différenciation histologique de la gonade. D'autre part, ce travail confirme la plus grande sensibilité de la gonade femelle à la FSH due à une expression plus importante du récepteur à la FSH. De plus, l'expression de ce récepteur augmente au cours du développement ovarien induisant une augmentation de la sensibilité aux effets de la FSH. Ces données confirment les travaux d'Akazome *et al.* qui ont montré que le récepteur de la FSH était plus exprimé dans l'ovaire que dans le testicule et que son expression était plus forte au jour 12 qu'au jour 6 (Akazome *et al.*, 2002). Chez les autres vertébrés, l'expression des récepteurs aux gonadotropines est également observée dès le début de la différenciation de la gonade comme chez les bovins (Wandji *et al.*, 1992), les porcins (Goxe *et al.*, 1993), le xenope (Urbatzka *et al.*, 2010) ou le babouin (Zachos *et al.*, 2003). Cependant, chez le rat, l'expression de *FSHR* n'apparaît dans l'ovaire qu'après la naissance tandis qu'elle apparaît dans le testicule au jour 15 du développement embryonnaire (Richards *et al.*, 1979). D'autre part, chez le porc, *FSHR* et *LHR* sont plus exprimés dans le testicule embryonnaire que dans l'ovaire reflétant la mise en place des cellules de Leydig qui sécrètent une quantité plus importante de testostérone que l'ovaire où aucun follicule en croissance n'est retrouvé (Goxe *et al.*, 1993). Ainsi, la sensibilité aux hormones gonadotropes serait corrélée avec l'activité stéroïdogène de la gonade embryonnaire comme chez le poulet où la production de stéroïdes est plus importante dans l'ovaire.

Au cours de nos expériences, nous avons montré l'augmentation de la sensibilité à la FSH pendant la différenciation ovarienne, conséquence d'une expression plus importante de *FSHR* mais sans influence de la FSH elle-même sur cette expression. Pourtant, suite à une adénohypophysectomie précoce (44h d'incubation), il est observé une diminution des niveaux

d'expression du récepteur à la FSH et à la LH aux jours 9 et 13 (Sanchez-Bringas *et al.*, 2006) suggérant une régulation des récepteurs par les hormones gonadotropes. Ces résultats sont néanmoins à moduler par le fait qu'ils n'aient pas été obtenus par PCR en temps réel et ne sont donc pas quantitatifs. Cependant, la FSH augmentant la prolifération des cellules ovariennes (Velazquez *et al.*, 1997; Mendez-Herrera *et al.*, 1998; Pedernera *et al.*, 1999), la diminution de l'expression du récepteur après adénohypophysectomie pourrait être une conséquence de la diminution du nombre de cellules. Or lors des études des effets de la FSH sur la prolifération dans les cultures de gonades embryonnaires dissociés, les effets sur la prolifération cellulaire sont visibles dès 60h de culture. Nous envisageons de vérifier si dans le cadre des cultures organotypiques, les effets de la FSH sur la prolifération sont également retrouvés. D'autre part, chez les mammifères, la FSH et les œstrogènes agissent en synergie pour stimuler l'expression de *FSHR* en augmentant le nombre de cellules de granulosa. De manière similaire, chez le poulet, les œstrogènes pourraient par l'augmentation de la prolifération augmenter les niveaux de *FSHR*. Néanmoins, dans les cultures de cellules ovariennes de poulet au jour 18, l'ajout de  $17\beta$ -œstradiol ne modifie pas les niveaux de prolifération (Velazquez *et al.*, 1997). Ces expériences ayant été réalisés uniquement à ce stade tardif, cela n'exclut pas un rôle mitogène des estrogènes à des stades antérieurs.

Dans les cellules de granulosa des poules adultes, plusieurs voies de signalisation de la FSH ont été identifiées. Comme chez les mammifères, les effets de la FSH sur l'augmentation de l'expression et de l'activité de STAR et sur l'augmentation de la production de P4 sont médiés par l'activation de la voie AMPc/PKA (Johnson *et al.*, 2001). D'autre part, l'activation de la voie des MAPK (mitogen activated kinase-like protein) via l'activation de EGFR (epidermal growth factor receptor) (Johnson *et al.*, 2001) ainsi que l'activation de la voie PKC (Woods *et al.*, 2007a; Woods *et al.*, 2007b) supprime les effets de la FSH sur la synthèse protéique de STAR et sur la production de la progestérone par les cellules de granulosa indifférenciée tandis qu'au cours du développement folliculaire, les deux voies deviennent stimulatrices de l'expression de STAR et de la production de P4 (Woods *et al.*, 2007a). D'autre part, les effets prolifératifs de la FSH sur les cellules ovariennes embryonnaires de poulet sont médiés par l'activation de la PKT (Peralta *et al.*, 2009).

Nous envisageons de poursuivre ces travaux sur le rôle de la FSH au cours de la différenciation gonadique chez le poulet, par l'investigation de ces différentes voies.



### *b- Les effets de BMP4*

Cette étude sur le rôle de BMP4 dans la gonade embryonnaire de poulet est la première à montrer une voie fonctionnelle des BMPs dès le début de la différenciation de la gonade que ce soit chez le mâle ou chez la femelle. Néanmoins, lors de ces expériences, il a été utilisé une protéine recombinante humaine présentant 84% d'identité de séquence avec la protéine de poulet ; l'utilisation d'un système hétérologue pourrait expliquer en partie la variabilité observée dans les réponses à BMP4 et il est possible que les effets observés seraient plus marqués en utilisant un système homologue. Cependant, BMP4 semble être un régulateur de la production basale et induite par la FSH de la progestérone via une régulation des gènes *STAR* et *CYP11A1* et en absence d'effet sur l'expression du récepteur à la FSH. Dès lors, BMP4 pourrait agir en régulant l'activité de l'adénylate cyclase induite par la FSH comme c'est le cas chez les mammifères (Pierre *et al.*, 2004; Knight *et al.*, 2006). De plus, la signalisation des BMPs et de la FSH utilise également la voie des MAPK dans les cellules de granulosa des mammifères (Moore *et al.*, 2001; Dewi *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2005; Miyoshi *et al.*, 2007). Cependant, ces BMPs sont potentialisateur des effets de la FSH sur la phosphorylation de P38 et par ce biais stimulateur de la production d'œstradiol par les cellules de granulosa de rat (Inagaki *et al.*, 2009). De plus, l'inhibition de la phosphorylation de Erk1/2 surprime les effets mitogènes de BMP15 sur ces cellules sans affecter la production de progestérone (Moore *et al.*, 2003). Néanmoins, l'investigation de l'implication de ces différentes voies dans notre modèle pourrait permettre de mieux comprendre l'action des BMPs et pourrait permettre de déterminer si par ce biais les BMPs peuvent réguler les effets de la FSH.

De plus, la stimulation importante par la FSH et l'inhibition par BMP4 de la production de progestérone, nous amène à nous interroger sur l'importance de ce stéroïde au cours de la mise en place de l'ovaire chez le poulet. Lors de la première étude, nous avons montré que l'ovaire comme le testicule embryonnaire de poulet exprimaient le récepteur à la progestérone (PR) suggérant une action paracrine de ce stéroïde. De façon similaire à l'ovaire de poulet, l'ovaire embryonnaire de rat ne possède pas de follicules qui se mettent en place après la naissance (les ovocytes étant organisés en nids) et sécrètent des niveaux importants de P4 (Kezele *et al.*, 2003).

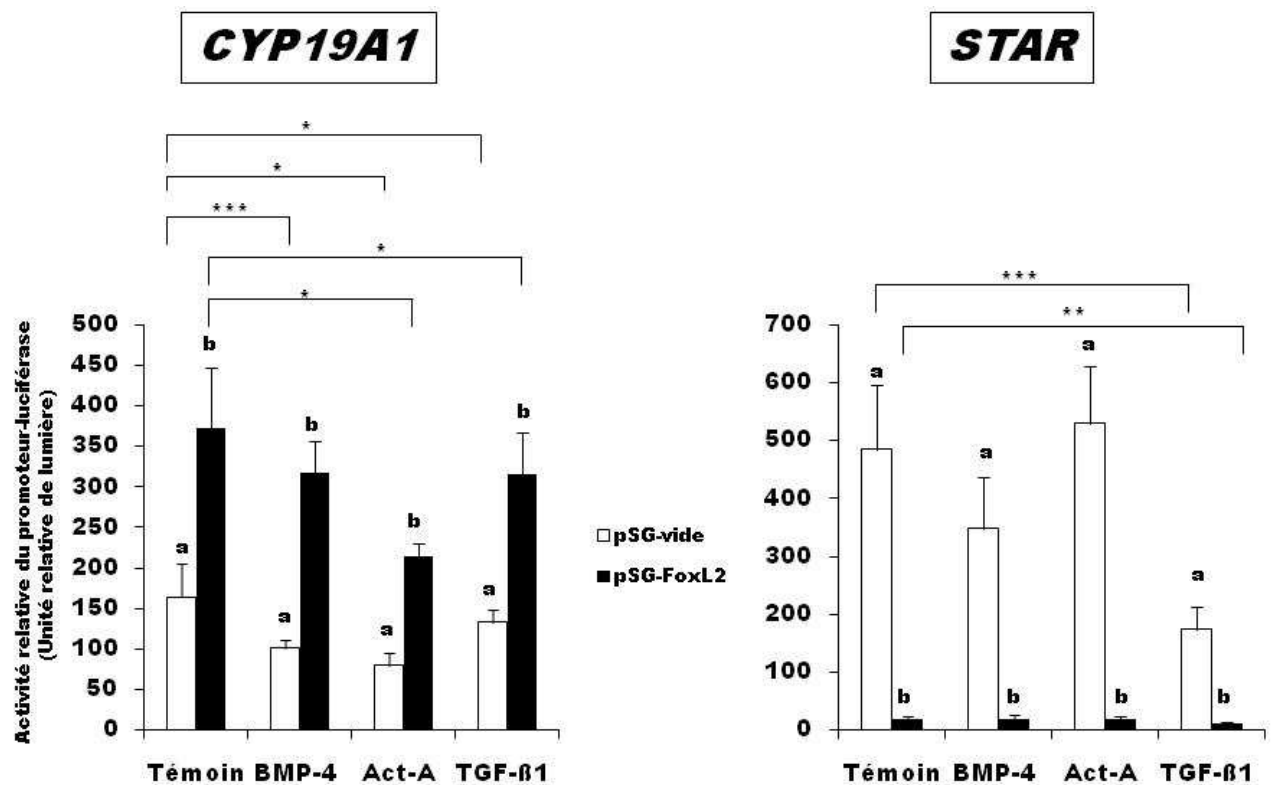


Figure 15 : Effets des différents membres de la famille du TGFβ sur l'activité transcriptionnelle de FOXL2 dans les cellules de granulosa de brebis.

Les cellules de granulosa de petits follicules à antrum de brebis sont cultivées pendant 24h avec 5% de sérum ovin fœtal. Ces cellules sont ensuite transfectées avec la construction promoteur-luciférase (*CYP19A1* ou *STAR*) associée à un plasmide exprimant ou non *FOXL2*. Pour chacune de ces associations, les cellules sont traitées pendant 48h avec ou sans BMP4 (50ng/ml), Activine-A (50ng/ml) ou TGFβ1 (5ng/ml). Les lettres différentes indiquent les effets significatifs de l'expression de FOXL2 sur l'activité luciférase pour chacune des conditions de traitement ( $p < 0.05$ ). Les astérisques indiquent les effets significatifs des traitements sur les activités luciférase (\*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Lors de culture d'ovaires de rats prélevés à la naissance (J0), l'ajout de P4 inhibe la formation des follicules primordiaux et la transition de ces follicules en follicules primaires (Kezele *et al.*, 2003). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la P4 jouerait un rôle similaire dans l'ovaire embryonnaire de poulet en retardant la mise en place de l'organisation folliculaire.

Outre son effet sur la progestérone, nous avons montré que BMP4 était un inhibiteur de la synthèse de l'œstradiol par inhibition de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de l'aromatase. Ainsi, BMP4 qui est un facteur plus exprimé dans l'ovaire ne semble pas être un facteur qui promeut le développement ovarien. D'autre part, nous avons étudié les effets de BMP4 sur l'expression de *FOXL2* dont la protéine est impliquée chez les mammifères dans l'inhibition de l'expression du gène *STAR* et dans la stimulation de celle de *CYP19A1*. Or nous avons observé des effets inhibiteurs de BMP4 sur l'expression de ces deux gènes sans modification de l'expression de *FOXL2*. Outre une action sur l'expression de ce gène, la signalisation des BMPs pourrait moduler l'activité de ce facteur de transcription sur les promoteurs de ses gènes cibles. Cependant, dans les cultures de cellules de granulosa de petits follicules à antrum de brebis cycliques, si BMP4 seul est inhibiteur de l'activité du promoteur de *CYP19A1*, il ne modifie pas l'activité stimulatrice de *FOXL2* sur ce promoteur (Figure 15) (données non publiées obtenues lors de mon stage de MII sous la direction de S.Fabre) et de façon similaire BMP4 ne modifie pas l'inhibition exercée par *FOXL2* sur l'expression de *STAR*. Ces données renforcent l'idée que l'action de BMP4 sur la transcription des gènes de l'aromatase et de *STAR* est indépendante de l'action de *FOXL2*.

## **2- Régulation de l'expression de l'AMH**

Ce travail de thèse a également permis de mettre en évidence un rôle inhibiteur de la FSH et de BMP4 sur l'expression de l'AMH. Hormis une concentration plasmatique de FSH plus importante dans l'embryon mâle, l'expression plus faible de *FSHR* et donc une sensibilité moindre aux gonadotropines sont cohérentes avec une expression plus importante et indispensable de l'AMH au cours du développement testiculaire. Ainsi, BMP4 serait un facteur « anti-testiculaire » dont la plus faible expression dans le testicule serait favorable à l'expression de l'AMH.

### **a- Le rôle de *SOX9***

Dans les testicules prélevés et cultivés au jour 9 de développement, la diminution de l'expression de l'AMH par la FSH est associée à une diminution de l'expression de *SOX9*.

Bien que l'expression de *SOX9* mais également de *SOX3*, *SOX4* et *SOX11* (Takada *et al.*, 2005) soit temporellement postérieure au début de l'expression de l'*AMH*, il n'est pas exclu que ces gènes soient des régulateurs de l'expression de l'*AMH* au cours du développement testiculaire.

Dès lors l'action de la FSH pourrait être médiée par une diminution de l'expression de *SOX9*. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de coupler le promoteur de poulet de l'*AMH* à une activité luciférase et de mesurer l'activité de ce promoteur en présence d'un vecteur d'expression de *SOX9*. L'utilisation de lignées de cellules exprimant, à leur surface, le récepteur à la FSH (par ex : cellules KGN) permettrait ensuite de regarder les effets de la FSH sur cette activité du promoteur en présence ou absence de *SOX9*. Néanmoins, dans l'ovaire, nous avons observé une diminution de l'*AMH* suite au traitement par la FSH alors que dans cette gonade femelle, l'expression de *SOX9* est absente indiquant que la FSH est capable de réguler l'expression de l'*AMH* d'une autre manière que par l'inhibition de la transcription de *SOX9*.

#### ***b- L'action des stéroïdes***

Lors du développement ovarien, la synthèse plus importante de testostérone et l'expression plus importante du récepteur aux androgènes suggèrent une action paracrine de ce stéroïde. Or chez les mammifères, les androgènes sont des inhibiteurs de l'expression de l'*AMH*. En effet dans les petits follicules à antrum bovins la T4 induit une diminution de l'expression de l'*AMH*. Ainsi l'action inhibitrice de la FSH sur l'expression de l'*AMH* pourrait être la conséquence de la stimulation de la sécrétion de T4. Afin d'investiguer cette voie de régulation nous envisageons de cultiver des gonades embryonnaires de poulet en présence d'androgènes.

D'autre part, les expériences d'inversion du sexe femelle-mâle par inhibition de l'aromatase, montrent une augmentation de l'expression de l'*AMH* (Vaillant *et al.*, 2001b) suggérant que les œstrogènes réguleraient négativement cette expression. De façon cohérente avec cette hypothèse, l'inhibition de l'*AMH* par la FSH s'accompagne d'une augmentation de l'œstradiol.

Néanmoins, alors que dans les gonades femelles, BMP4 inhibe l'expression de l'*AMH* il est également inhibiteur de la synthèse des œstrogènes et dans les cultures de cellules de granulosa des follicules hiérarchiques de poules, le traitement avec l'œstradiol ne modifie pas l'expression de l'*AMH* (Johnson *et al.*, 2008). Ainsi, il semblerait que lors des inversions du

sexe, l'augmentation de l'AMH suite à l'inhibition de la synthèse des œstrogènes pourrait ne pas être la conséquence d'un effet direct.

### **3- L'implication des BMPs dans un autre modèle d'étude.**

Cette étude sur l'implication d'un membre de la famille des TGF $\beta$  au cours de la différenciation gonadique s'est en partie inscrite dans un programme de transversalité inter-espèces (brebis, chèvre, truite arc-en-ciel et poulet) ayant fait l'objet d'un financement par les crédits incitatifs du département PHASE de l'INRA.

Au cours de la différenciation gonadique chez la truite arc-en-ciel, il a également été démontré un dimorphisme sexuel dans les profils d'expression de plusieurs membres de la famille des TGF $\beta$  avec une surexpression des sous-unités inhibine/activine au cours de la différenciation testiculaire et une expression préférentielle de *GDF9* et *BMP7* dans la gonade femelle (Baron *et al.*, 2005). De plus, il a également été réalisé des cultures de gonades embryonnaires en présence de différentes protéines recombinantes humaines (BMP3, BMP5, BMP4 et BMP6). Dans ce modèle, l'utilisation d'un système hétérologue a entraîné une très haute variabilité des résultats (66% d'identité de séquence entre la protéine recombinante humaine de BMP4 et celle de truite arc-en-ciel). Néanmoins, les données préliminaires obtenues avec BMP4 montrent qu'il n'a pas d'effet sur les gènes ovariens (*CYP19A1* et *FOXL2*) mais de façon intéressante, il inhibe l'expression de *CYP26b* qui est un gène « testiculaire ». Il semblerait donc que chez ce poisson comme chez le poulet, BMP4 aurait un rôle anti-testiculaire (Données personnelles de Y.Guiguen et A.Fostier, INRA, SCRIBE, Rennes).

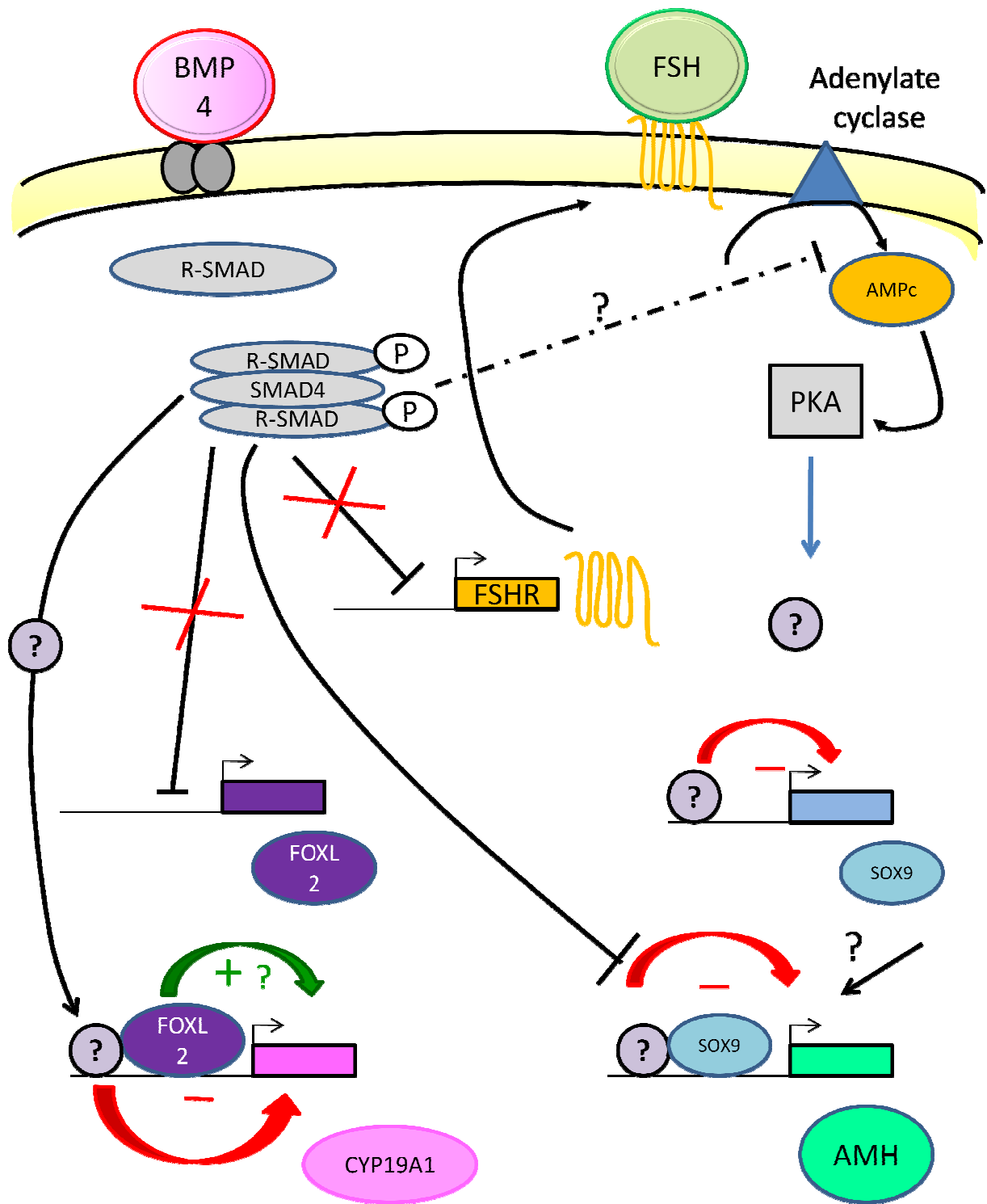


Figure 16: rôle de BMP4 et FSH dans les gonades embryonnaires de poulet: résultats connus et perspectives.

## Conclusions

En conclusion, ce travail de thèse a dans sa première partie ouvert de nouvelles pistes d'investigations dans la différenciation gonadique chez le poulet, en mettant en évidence plusieurs nouveaux acteurs moléculaires dont les fonctions dans ce processus restent à explorer. Parmi ces acteurs se trouvent les membres de la superfamille du TGF $\beta$  dont plusieurs BMPs ont été trouvés préférentiellement exprimés dans l'ovaire embryonnaire. L'étude fonctionnelle du rôle d'un de ces BMPs, BMP4, et de la FSH a mis en évidence leurs implications; par des effets opposés, dans la régulation de la stéroïdogénèse. En effet, la FSH est stimulateur des productions d'œstrogènes et de progestérone tandis que BMP4 inhibe la production basale et induite par la FSH de progestérone et inhibe la production basale d'œstradiol. Ainsi, cette première étude fonctionnelle d'un membre des BMPs au cours de la différenciation gonadique chez le poulet, tend à montrer que BMP4 serait un frein à une stéroïdogénèse trop importante. D'autre part, la FSH comme BMP4 sont inhibiteurs de l'expression de l'*AMH* considéré comme un acteur majeur de la différenciation des cordons testiculaires qui nous conduit à émettre l'hypothèse que BMP4 serait un facteur « anti-testiculaire ». Cependant, les mécanismes ou les voies de signalisations impliquées dans ces régulations restent à être élucidés (Figure 16). De plus, ce travail pourrait être complété par l'étude d'autres membres de la superfamille du TGF $\beta$  qui présentaient un dimorphisme sexuel dans leurs profils d'expression. Et il est ainsi envisagé de réaliser des études fonctionnelles sur l'implication des activines au cours du développement testiculaire. De même, *BMP3* qui est préférentiellement exprimé dans l'ovaire gauche est un membre des BMPs peu étudié dans les autres modèles et qui semble être un inhibiteur de la signalisation des autres BMPs (Gamer *et al.*, 2008; Gamer *et al.*, 2009). Ainsi, l'étude des fonctions de ce facteur apporterait un nouvel éclairage sur l'implication des BMPs dans le développement gonadique chez le poulet.

## Références bibliographiques

**Abinawanto, Shimada, K., Yoshida, K. and Saito, N.** (1996). "Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450 (17 alpha) and P450 arom messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos." Gen Comp Endocrinol **102**(2): 241-6.

**Abinawanto, S., K. Saito, N. Sugishima, T. Shiokawa, E** (1997). "Sex-reversal effects of non-steroidal aromatase inhibitor on aromatase(P450arom) mRNA expression in adult chicken gonads." Jpn Poult Sci **34**: 158-168.

**Adams, I. R. and McLaren, A.** (2002). "Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis." Development **129**(5): 1155-64.

**Agate, R. J., Grisham, W., Wade, J., Mann, S., Wingfield, J., Schanen, C., Palotie, A. and Arnold, A. P.** (2003). "Neural, not gonadal, origin of brain sex differences in a gynandromorphic finch." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4873-8.

**Akazome, Y., Abe, T. and Mori, T.** (2002). "Differentiation of chicken gonad as an endocrine organ: expression of LH receptor, FSH receptor, cytochrome P450c17 and aromatase genes." Reproduction **123**(5): 721-8.

**Al-Musawi, S. L., Gladwell, R. T. and Knight, P. G.** (2007). "Bone morphogenetic protein-6 enhances gonadotrophin-dependent progesterone and inhibin secretion and expression of mRNA transcripts encoding gonadotrophin receptors and inhibin/activin subunits in chicken granulosa cells." Reproduction **134**(2): 293-306.

**Andrews, J. E., Smith, C. A. and Sinclair, A. H.** (1997). "Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo." Gen Comp Endocrinol **108**(2): 182-90.

**Arango, N. A., Lovell-Badge, R. and Behringer, R. R.** (1999). "Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development." Cell **99**(4): 409-19.

**Bagheri-Fam, S., Sinclair, A. H., Koopman, P. and Harley, V. R.** (2010). "Conserved regulatory modules in the *Sox9* testis-specific enhancer predict roles for SOX, TCF/LEF, Forkhead, DMRT, and GATA proteins in vertebrate sex determination." Int J Biochem Cell Biol **42**(3): 472-7.

**Bai, X. H., Wang, D. W., Luan, Y., Yu, X. P. and Liu, C. J.** (2009). "Regulation of chondrocyte differentiation by ADAMTS-12 metalloproteinase depends on its enzymatic activity." Cell Mol Life Sci **66**(4): 667-80.



- Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y. C., Goodheart, M. L., Carpenter, A. E., de Rooij, D. G. and Page, D. C.** (2006). "In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication." Nat Genet **38**(12): 1430-4.
- Bannister, S. C., Tizard, M. L., Doran, T. J., Sinclair, A. H. and Smith, C. A.** (2009). "Sexually dimorphic microRNA expression during chicken embryonic gonadal development." Biol Reprod **81**(1): 165-76.
- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., Worley, K. C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E. R., Fraccaro, M. and et al.** (1994). "A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal." Nat Genet **7**(4): 497-501.
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X., Fellous, M., Guiguen, Y. and Veitia, R. A.** (2004). "An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation." J Mol Endocrinol **33**(3): 705-15.
- Baron, D., Houlgatte, R., Fostier, A. and Guiguen, Y.** (2005). "Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout." Biol Reprod **73**(5): 959-66.
- Baverstock, P. R., Adams, M., Polkinghorne, R. W. and Gelder, M.** (1982). "A sex-linked enzyme in birds--Z-chromosome conservation but no dosage compensation." Nature **296**(5859): 763-6.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P. and Izaurralde, E.** (2006). "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes." Genes Dev **20**(14): 1885-98.
- Berggren, K., McCaffery, P., Drager, U. and Forehand, C. J.** (1999). "Differential distribution of retinoic acid synthesis in the chicken embryo as determined by immunolocalization of the retinoic acid synthetic enzyme, RALDH-2." Dev Biol **210**(2): 288-304.
- Bernard, P. and Harley, V. R.** (2007). "Wnt4 action in gonadal development and sex determination." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 31-43.
- Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J. A., Parker, K. L., Porter, F. D. and Westphal, H.** (2000). "The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation." Nature **403**(6772): 909-13.
- Blentic, A., Gale, E. and Maden, M.** (2003). "Retinoic acid signalling centres in the avian embryo identified by sites of expression of synthesising and catabolising enzymes." Dev Dyn **227**(1): 114-27.
- Bodensteiner, K. J., Clay, C. M., Moeller, C. L. and Sawyer, H. R.** (1999). "Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries." Biol Reprod **60**(2): 381-6.

- Boitani, C., Stefanini, M., Fragale, A. and Morena, A. R.** (1995). "Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development." Endocrinology **136**(12): 5438-44.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H. and Koopman, P.** (2006). "Retinoid signaling determines germ cell fate in mice." Science **312**(5773): 596-600.
- Brankin, V., Quinn, R. L., Webb, R. and Hunter, M. G.** (2005). "Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary." Domest Anim Endocrinol **28**(4): 367-79.
- Brennan, J., Karl, J. and Capel, B.** (2002). "Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad." Dev Biol **244**(2): 418-28.
- Britt, K. L., Drummond, A. E., Dyson, M., Wreford, N. G., Jones, M. E., Simpson, E. R. and Findlay, J. K.** (2001). "The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse." J Steroid Biochem Mol Biol **79**(1-5): 181-5.
- Britt, K. L. and Findlay, J. K.** (2003). "Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen." Mol Cell Endocrinol **202**(1-2): 11-7.
- Buehr, M., Gu, S. and McLaren, A.** (1993). "Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse." Development **117**(1): 273-81.
- Burgoyne, P. S., Buehr, M. and McLaren, A.** (1988). "XY follicle cells in ovaries of XX----XY female mouse chimaeras." Development **104**(4): 683-8.
- Burke, W. H. and Henry, M. H.** (1999). "Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor." Poult Sci **78**(7): 1019-33.
- Buzzard, J. J., Farnworth, P. G., De Kretser, D. M., O'Connor, A. E., Wreford, N. G. and Morrison, J. R.** (2003). "Proliferative phase sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro." Endocrinology **144**(2): 474-83.
- Campbell, B. K. and Baird, D. T.** (2001). "Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep." J Endocrinol **169**(2): 333-45.
- Campbell, B. K., Souza, C. J., Skinner, A. J., Webb, R. and Baird, D. T.** (2006). "Enhanced response of granulosa and theca cells from sheep carriers of the FecB mutation in vitro to gonadotropins and bone morphogenetic protein-2, -4, and -6." Endocrinology **147**(4): 1608-20.
- Carre-Eusebe, D., Coudouel, N. and Magre, S.** (2009). "OVEX1, a novel chicken endogenous retrovirus with sex-specific and left-right asymmetrical expression in gonads." Retrovirology **6**: 59.

**Chassot, A. A., Gregoire, E. P., Magliano, M., Lavery, R., Chaboissier, M. C., Ranc, F., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., de Rooij, D. G. and Schedl, A.** (2008a). "Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player  
Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary." Sex Dev **2**(4-5): 219-27.7

**Chassot, A. A., Ranc, F., Gregoire, E. P., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., de Rooij, D. G., Schedl, A. and Chaboissier, M. C.** (2008b). "Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary." Hum Mol Genet **17**(9): 1264-77.

**Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J. and Letarte, M.** (1992). "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells." J Biol Chem **267**(27): 19027-30.

**Chuma, S. and Nakatsuji, N.** (2001). "Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling." Dev Biol **229**(2): 468-79.

**Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E. and Hsueh, A. J.** (1996). "Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor." Endocrinology **137**(4): 1447-56.

**Civinini, A. and Mastrolia, L.** (1986). "Ultrastructural localization of acid phosphatase in germ cells of chick embryo left ovary." Exp Cell Biol **54**(2): 94-105.

**Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M. and Veitia, R. A.** (2002). "Evolution and expression of FOXL2." J Med Genet **39**(12): 916-21.

**Cook, R. W., Thompson, T. B., Jardtetzky, T. S. and Woodruff, T. K.** (2004). "Molecular biology of inhibin action." Semin Reprod Med **22**(3): 269-76.

**Couse, J. F. and Korach, K. S.** (1999). "Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse." Ann Endocrinol (Paris) **60**(2): 143-8.

**Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M. S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A. and Pilia, G.** (2001). "The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome." Nat Genet **27**(2): 159-66.

**Cupp, A. S., Kim, G. and Skinner, M. K.** (1999). "Expression and action of transforming growth factor beta (TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3) during embryonic rat testis development." Biol Reprod **60**(6): 1304-13.

**Davis, A. J., Brooks, C. F. and Johnson, P. A.** (2000). "Estradiol regulation of follistatin and inhibin alpha- and beta(B)-subunit mRNA in avian granulosa cells." Gen Comp Endocrinol **119**(3): 308-16.

**Davis, A. J., Brooks, C. F. and Johnson, P. A.** (2001). "Activin A and gonadotropin regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNA in avian granulosa cells." Biol Reprod **65**(5): 1352-8.

**de Kretser, D. M., Buzzard, J. J., Okuma, Y., O'Connor, A. E., Hayashi, T., Lin, S. Y., Morrison, J. R., Loveland, K. L. and Hedger, M. P.** (2004). "The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology." Mol Cell Endocrinol **225**(1-2): 57-64.

**De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F. and Berta, P.** (1998). "Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene." Mol Cell Biol **18**(11): 6653-65.

**Dewi, D. A., Abayasekara, D. R. and Wheeler-Jones, C. P.** (2002). "Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific." Endocrinology **143**(3): 877-88.

**Di Carlo, A. and De Felici, M.** (2000). "A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell development." Dev Biol **226**(2): 209-19.

**di Clemente, N., Ghaffari, S., Pepinsky, R. B., Pieau, C., Josso, N., Cate, R. L. and Vigier, B.** (1992). "A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-mullerian hormone: the fetal ovary aromatase assay." Development **114**(3): 721-7.

**Doesburg, P., Kuil, C. W., Berrevoets, C. A., Steketee, K., Faber, P. W., Mulder, E., Brinkmann, A. O. and Trapman, J.** (1997). "Functional in vivo interaction between the amino-terminal, transactivation domain and the ligand binding domain of the androgen receptor." Biochemistry **36**(5): 1052-64.

**Doi, O. and Hutson, J. M.** (1988). "Pretreatment of chick embryos with estrogen in ovo prevents mullerian duct regression in organ culture." Endocrinology **122**(6): 2888-91.

**Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N. and Matzuk, M. M.** (1996). "Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis." Nature **383**(6600): 531-5.

**Dooley, C. A., Attia, G. R., Rainey, W. E., Moore, D. R. and Carr, B. R.** (2000). "Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3331-7.

**Dorrington, J. H., Bendell, J. J. and Khan, S. A.** (1993). "Interactions between FSH, estradiol-17 beta and transforming growth factor-beta regulate growth and differentiation in the rat gonad." J Steroid Biochem Mol Biol **44**(4-6): 441-7.

**Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P. and Mark, M.** (2000). "Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes." Development **127**(19): 4277-91.

**Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A. and Themmen, A. P.** (2002a). "Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary." Endocrinology **143**(3): 1076-84.

**Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A. and Themmen, A. P.** (1999). "Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary." Endocrinology **140**(12): 5789-96.

**Durlinger, A. L., Visser, J. A. and Themmen, A. P.** (2002b). "Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone." Reproduction **124**(5): 601-9.

**Elbrecht, A. and Smith, R. G.** (1992). "Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens." Science **255**(5043): 467-70.

**Elis, S., Dupont, J., Couty, I., Persani, L., Govoroun, M., Blesbois, E., Batellier, F. and Monget, P.** (2007). "Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary." J Endocrinol **194**(3): 485-97.

**Ellegren, H.** (2000). "Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination." Trends Ecol Evol **15**(5): 188-192.

**Ellegren, H.** (2002). "Dosage compensation: do birds do it as well?" Trends Genet **18**(1): 25-8.

**Ellsworth, B. S., Burns, A. T., Escudero, K. W., Duval, D. L., Nelson, S. E. and Clay, C. M.** (2003). "The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein." Mol Cell Endocrinol **206**(1-2): 93-111.

**Elvin, J. A., Yan, C. and Matzuk, M. M.** (2000). "Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility." Mol Cell Endocrinol **159**(1-2): 1-5.

**Erickson, G. F.** (1974). "The control of the differentiation of female embryonic germ cells in the bird." Dev Biol **36**(1): 113-29.

**Etches, R., Kagami H** (1997). "Genotypic and phenotypic sex reversal." Perspectives in avian endocrinology. Journal of endocrinologyLtd, Bristol.: 57-67.

**Eusebe, D., di Clemente, N., Rey, R., Pieau, C., Vigier, B., Josso, N. and Picard, J. Y.** (1996). "Cloning and expression of the chick anti-Mullerian hormone gene." J Biol Chem **271**(9): 4798-804.

**Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., Monget, P. and Monniaux, D.** (2006). "Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models." Reprod Biol Endocrinol **4**: 20.

- Fitzpatrick, S. L. and Richards, J. S.** (1993). "Regulation of the rat aromatase gene in ovarian granulosa cells and R2C Leydig cells." J Steroid Biochem Mol Biol **44**(4-6): 429-33.
- Fleming, A., Wibbels, T., Skipper, J. K. and Crews, D.** (1999). "Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination." Gen Comp Endocrinol **116**(3): 336-46.
- Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M. and Kito, S.** (2000). "The primordial to primary follicle transition." Mol Cell Endocrinol **163**(1-2): 53-60.
- 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. and et al.** (1994). "Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene." Nature **372**(6506): 525-30.
- Fujimoto, T., Ukeshima, A. and Kiyofuji, R.** (1976). "The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo." Anat Rec **185**(2): 139-45.
- Gage, P. J., Suh, H. and Camper, S. A.** (1999). "The bicoid-related Pitx gene family in development." Mamm Genome **10**(2): 197-200.
- Galli, F. and Wassermann, G. F.** (1972). "Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos." Gen Comp Endocrinol **19**(3): 509-14.
- Galli, F. E. and Wassermann, G. F.** (1973). "Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos." Gen Comp Endocrinol **21**(1): 77-83.
- Galloway, S. M., Gregan, S. M., Wilson, T., McNatty, K. P., Juengel, J. L., Ritvos, O. and Davis, G. H.** (2002). "Bmp15 mutations and ovarian function." Mol Cell Endocrinol **191**(1): 15-8.
- Gamer, L. W., Cox, K., Carlo, J. M. and Rosen, V.** (2009). "Overexpression of BMP3 in the developing skeleton alters endochondral bone formation resulting in spontaneous rib fractures." Dev Dyn **238**(9): 2374-81.
- Gamer, L. W., Ho, V., Cox, K. and Rosen, V.** (2008). "Expression and function of BMP3 during chick limb development." Dev Dyn **237**(6): 1691-8.
- Gasc, J. M.** (1980). "Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation." J Embryol Exp Morphol **55**: 331-42.
- Gazzerro, E. and Canalis, E.** (2006). "Bone morphogenetic proteins and their antagonists." Rev Endocr Metab Disord **7**(1-2): 51-65.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y. I. and Knaus, P.** (2000). "Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors." Mol Biol Cell **11**(3): 1023-35.

**Ginsburg, M. and Eyal-Giladi, H.** (1986). "Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo." J Embryol Exp Morphol **95**: 53-71.

**Giuli, G., Shen, W. H. and Ingraham, H. A.** (1997). "The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo." Development **124**(9): 1799-807.

**Glister, C., Kemp, C. F. and Knight, P. G.** (2004). "Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin." Reproduction **127**(2): 239-54.

**Glister, C., Richards, S. L. and Knight, P. G.** (2005). "Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling?" Endocrinology **146**(4): 1883-92.

**Gomez, Y., Velazquez, P. N., Peralta-Delgado, I., Mendez, M. C., Vilchis, F., Juarez-Oropeza, M. A. and Pedernera, E.** (2001). "Follicle-stimulating hormone regulates steroidogenic enzymes in cultured cells of the chick embryo ovary." Gen Comp Endocrinol **121**(3): 305-15.

**Gonzalez, C. B., Charreau, E. H., Aragonés, A., Lantos, C. P. and Follett, B. K.** (1987). "The ontogenesis of reproductive hormones in the female embryo of the domestic fowl." Gen Comp Endocrinol **68**(3): 369-74.

**Govoroun, M. S., Pannetier, M., Pailhoux, E., Cocquet, J., Brillard, J. P., Couty, I., Batellier, F. and Cotinot, C.** (2004). "Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development." Dev Dyn **231**(4): 859-70.

**Goxe, B., Prunier, A., Remy, J. J. and Salesse, R.** (1993). "Ontogeny of gonadal luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in the fetal pig and related changes in gonadotropin and testosterone secretion." Biol Reprod **49**(3): 609-16.

**Gray, P. C., Harrison, C. A. and Vale, W.** (2003). "Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5193-8.

**Grumbach, M. M. a. C., F.A.** (1992). Disorders of sex differentiation Williams Textbook of Endocrinology. Saunders. Philadelphia: 853-951

**Grzegorzewska, A. K., Sechman, A., Paczoska-Eliasiewicz, H. E. and Rzasa, J.** (2009). "The expression of pituitary FSHbeta and LHbeta mRNA and gonadal FSH and LH receptor mRNA in the chicken embryo." Reprod Biol **9**(3): 253-69.

**Guichard, A., Cedard, L. and Haffen, K.** (1973). "[Comparative aspect of the synthesis of sex steroids by chick embryonal gonads at different stages of development (study in organ culture in the presence of radioactive precursors)]." Gen Comp Endocrinol **20**(1): 16-28.

**Guichard, A., Cedard, L., Mignot, T. M., Scheib, D. and Haffen, K.** (1977a). "Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: differences according to age, sex, and side." Gen Comp Endocrinol **32**(3): 255-65.

**Guichard, A., Cedard, L., Mignot, T. M., Scheib, D. and Haffen, K.** (1979). "Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroid precursors." Gen Comp Endocrinol **39**(1): 9-19.

**Guichard, A., Scheib, D., Haffen, K. and Cedard, L.** (1977b). "Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture." J Steroid Biochem **8**(5): 599-602.

**Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J., Iseki, K., McMeel, O. M., Martin, S. A. and Fostier, A.** (1999). "Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Mol Reprod Dev **54**(2): 154-62.

**Guioli, S. and Lovell-Badge, R.** (2007). "PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary." Development **134**(23): 4199-208.

**Gumienny, T. L. and Padgett, R. W.** (2002). "The other side of TGF-beta superfamily signal regulation: thinking outside the cell." Trends Endocrinol Metab **13**(7): 295-9.

**Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R.** (1995). "Expression of Sry, the mouse sex determining gene." Development **121**(6): 1603-14.

**Hammes, A., Guo, J. K., Lutsch, G., Leheste, J. R., Landrock, D., Ziegler, U., Gubler, M. C. and Schedl, A.** (2001). "Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation." Cell **106**(3): 319-29.

**Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J.** (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." Nature **404**(6775): 293-6.

**Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. and Hannon, G. J.** (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." Science **293**(5532): 1146-50.

**Harland, R. and Gerhart, J.** (1997). "Formation and function of Spemann's organizer." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 611-67.

**Haselbeck, R. J., Hoffmann, I. and Duester, G.** (1999). "Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways." Dev Genet **25**(4): 353-64.

**He, X., Semenov, M., Tamai, K. and Zeng, X.** (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." Development **131**(8): 1663-77.



**Heikkila, M., Prunskaitė, R., Naillat, F., Itaranta, P., Vuoristo, J., Leppaluoto, J., Peltoketo, H. and Vainio, S.** (2005). "The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action." Endocrinology **146**(9): 4016-4023.

**Hérault, F., Le Meuth-Metzinger, Valérie, Désert Colette, Demeure Olivier, Douaire Madeleine** (2005). Agenae-chick, a tool for chicken transcriptome analyses Sixièmes journées de la recherche avicole. St Malo, France,

**Hillier, S. G. and Miro, F.** (1993). "Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology." Ann N Y Acad Sci **687**: 29-38.

**Hollander, W. F.** (1975). "Sectorial mosaics in the domestic pigeon: 25 more years." J Hered **66**(4): 177-202.

**Honda, S., Morohashi, K., Nomura, M., Takeya, H., Kitajima, M. and Omura, T.** (1993). "Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily." J Biol Chem **268**(10): 7494-502.

**Hori, T., Asakawa, S., Itoh, Y., Shimizu, N. and Mizuno, S.** (2000). "Wpkci, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination." Mol Biol Cell **11**(10): 3645-60.

**Hoshino, A., Koide, M., Ono, T. and Yasugi, S.** (2005). "Sex-specific and left-right asymmetric expression pattern of Bmp7 in the gonad of normal and sex-reversed chicken embryos." Dev Growth Differ **47**(2): 65-74.

**Hsueh, A. J., Dahl, K. D., Vaughan, J., Tucker, E., Rivier, J., Bardin, C. W. and Vale, W.** (1987). "Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(14): 5082-6.

**Hudson, Q. J., Smith, C. A. and Sinclair, A. H.** (2005). "Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary." Dev Dyn **233**(3): 1052-5.

**Hughes, G. C.** (1963). "The Population of Germ Cells in the Developing Female Chick." J Embryol Exp Morphol **11**: 513-36.

**Hutson, J., Ikawa, H. and Donahoe, P. K.** (1981). "The ontogeny of Mullerian inhibiting substance in the gonads of the chicken." J Pediatr Surg **16**(6): 822-7.

**Hutson, J. M., Ikawa, H. and Donahoe, P. K.** (1982). "Estrogen inhibition of Mullerian inhibiting substance in the chick embryo." J Pediatr Surg **17**(6): 953-9.

**Hutt, F. B.** (1949). Genetics of the Fowl, McGraw-Hill,

**Ikeda, Y., Shen, W. H., Ingraham, H. A. and Parker, K. L.** (1994). "Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases." Mol Endocrinol **8**(5): 654-62.

**Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T. J., Hentges, K. E., Zanaria, E., Lalli, E., Tamai, K. T., Sassone-Corsi, P., Lovell-Badge, R., Camerino, G. and Parker, K. L.** (1996). "Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development." Mol Endocrinol **10**(10): 1261-72.

**Inagaki, K., Otsuka, F., Miyoshi, T., Yamashita, M., Takahashi, M., Goto, J., Suzuki, J. and Makino, H.** (2009). "p38-Mitogen-activated protein kinase stimulated steroidogenesis in granulosa cell-oocyte cocultures: role of bone morphogenetic proteins 2 and 4." Endocrinology **150**(4): 1921-30.

**Ishimaru, Y., Komatsu, T., Kasahara, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Toyama, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., Chandraratna, R. A., Morohashi, K. and Yoshioka, H.** (2008). "Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos." Development **135**(4): 677-85.

**Itman, C., Mendis, S., Barakat, B. and Loveland, K. L.** (2006). "All in the family: TGF-beta family action in testis development." Reproduction **132**(2): 233-46.

**Itoh, T., Takeda, S. and Akao, Y.** (2010). "MicroRNA-208 modulates BMP-2-stimulated mouse preosteoblast differentiation by directly targeting V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1." J Biol Chem **285**(36): 27745-52.

**Jaatinen, R., Laitinen, M. P., Vuojolainen, K., Aaltonen, J., Louhio, H., Heikinheimo, K., Lehtonen, E. and Ritvos, O.** (1999). "Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B." Mol Cell Endocrinol **156**(1-2): 189-93.

**Jaatinen, R., Rosen, V., Tuuri, T. and Ritvos, O.** (1996). "Identification of ovarian granulosa cells as a novel site of expression for bone morphogenetic protein-3 (BMP-3/osteogenin) and regulation of BMP-3 messenger ribonucleic acids by chorionic gonadotropin in cultured human granulosa-luteal cells." J Clin Endocrinol Metab **81**(11): 3877-82.

**Jaleel, M., McBride, A., Lizcano, J. M., Deak, M., Toth, R., Morrice, N. A. and Alessi, D. R.** (2005). "Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate." FEBS Lett **579**(6): 1417-23.

**Jeays-Ward, K., Hoyle, C., Brennan, J., Dandonneau, M., Alldus, G., Capel, B. and Swain, A.** (2003). "Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad." Development **130**(16): 3663-70.

**Jenster, G., Trapman, J. and Brinkmann, A. O.** (1993). "Nuclear import of the human androgen receptor." Biochem J **293** ( Pt 3): 761-8.

**Jimenez-Krassel, F., Winn, M. E., Burns, D., Ireland, J. L. and Ireland, J. J.** (2003). "Evidence for a negative intrafollicular role for inhibin in regulation of estradiol production by granulosa cells." Endocrinology **144**(5): 1876-86.

**Johnson, A. L.** (2003). "Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles." Anim Reprod Sci **78**(3-4): 185-201.

**Johnson, A. L. and Bridgham, J. T.** (2001). "Regulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in hen granulosa cells." Endocrinology **142**(7): 3116-24.

**Johnson, A. L., Bridgham, J. T. and Wagner, B.** (1996a). "Characterization of a chicken luteinizing hormone receptor (cLH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cLH-R messenger ribonucleic acid in the ovary." Biol Reprod **55**(2): 304-9.

**Johnson, A. L., Bridgham, J. T., Witty, J. P. and Tilly, J. L.** (1996b). "Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-xlong gene expression." Endocrinology **137**(5): 2059-66.

**Johnson, A. L., Bridgham, J. T. and Woods, D. C.** (2004). "Cellular mechanisms and modulation of activin A- and transforming growth factor beta-mediated differentiation in cultured hen granulosa cells." Biol Reprod **71**(6): 1844-51.

**Johnson, P. A., Dickens, M. J., Kent, T. R. and Giles, J. R.** (2005). "Expression and function of growth differentiation factor-9 in an oviparous species, Gallus domesticus." Biol Reprod **72**(5): 1095-100.

**Johnson, P. A., Kent, T. R., Urick, M. E. and Giles, J. R.** (2008). "Expression and regulation of anti-mullerian hormone in an oviparous species, the hen." Biol Reprod **78**(1): 13-9.

**Johnson, P. A., Woodcock, J. R. and Kent, T. R.** (2006). "Effect of activin A and inhibin A on expression of the inhibin/activin beta-B-subunit and gonadotropin receptors in granulosa cells of the hen." Gen Comp Endocrinol **147**(2): 102-7.

**Kagami, H., Clark, M. E., Verrinder Gibbins, A. M. and Etches, R. J.** (1995). "Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline." Mol Reprod Dev **42**(4): 379-87.

**Kagami, H. and Hanada, H.** (1997a). "Current knowledge of sexual differential in domestic fowl Sexual differential in domestic fowl." World's Poultry Science Journal **53**(02): 111-123.

**Kagami, H., Tagami, T., Matsubara, Y., Harumi, T., Hanada, H., Maruyama, K., Sakurai, M., Kuwana, T. and Naito, M.** (1997b). "The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken." Mol Reprod Dev **48**(4): 501-10.

**Kamata, R., Takahashi, S. and Morita, M.** (2004). "Gene expression of sex-determining factors and steroidogenic enzymes in the chicken embryo: influence of xenoestrogens." Gen Comp Endocrinol **138**(2): 148-56.

**Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T.** (2003). "Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells." Biol Reprod **69**(2): 612-6.

**Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Iwano, T., Lee, J., Kazuki, Y., Inoue, K., Miki, H., Takehashi, M., Toyokuni, S., Shinkai, Y., Oshimura, M., Ishino, F., Ogura, A. and Shinohara, T.** (2005). "Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture." Development **132**(18): 4155-63.

**Karagenc, L., Cinnamon, Y., Ginsburg, M. and Petite, J. N.** (1996). "Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo." Dev Genet **19**(4): 290-301.

**Karl, J. and Capel, B.** (1998). "Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium." Dev Biol **203**(2): 323-33.

**Kato, M., Shimada, K., Saito, N., Noda, K. and Ohta, M.** (1995). "Expression of P450 17 alpha-hydroxylase and P450aromatase genes in isolated granulosa, theca interna, and theca externa layers of chicken ovarian follicles during follicular growth." Biol Reprod **52**(2): 405-10.

**Katoh, H., Ogino, Y. and Yamada, G.** (2006). "Cloning and expression analysis of androgen receptor gene in chicken embryogenesis." FEBS Lett **580**(6): 1607-15.

**Kent, J., Coriat, A. M., Sharpe, P. T., Hastie, N. D. and van Heyningen, V.** (1995). "The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates." Oncogene **11**(9): 1781-92.

**Kettlewell, J. R., Raymond, C. S. and Zarkower, D.** (2000). "Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation." Genesis **26**(3): 174-8.

**Kezele, P. and Skinner, M. K.** (2003). "Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly." Endocrinology **144**(8): 3329-37.

**Kim, I. C. and Schomberg, D. W.** (1989). "The production of transforming growth factor-beta activity by rat granulosa cell cultures." Endocrinology **124**(3): 1345-51.

**Kim, K. A., Zhao, J., Andarmani, S., Kakitani, M., Oshima, T., Binnerts, M. E., Abo, A., Tomizuka, K. and Funk, W. D.** (2006). "R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation." Cell Cycle **5**(1): 23-6.

**Kioussi, C., Briata, P., Baek, S. H., Rose, D. W., Hamblet, N. S., Herman, T., Ohgi, K. A., Lin, C., Gleiberman, A., Wang, J., Brault, V., Ruiz-Lozano, P., Nguyen, H. D., Kemler, R., Glass, C. K., Wynshaw-Boris, A. and Rosenfeld, M. G.** (2002). "Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development." Cell **111**(5): 673-85.

- Kispert, A., Vainio, S. and McMahon, A. P.** (1998). "Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney." Development **125**(21): 4225-34.
- Knight, P. G. and Glister, C.** (2003). "Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development." Anim Reprod Sci **78**(3-4): 165-83.
- Knight, P. G. and Glister, C.** (2006). "TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development." Reproduction **132**(2): 191-206.
- Kocer, A., Pinheiro, I., Pannetier, M., Renault, L., Parma, P., Radi, O., Kim, K. A., Camerino, G. and Pailhoux, E.** (2008). "R-spondin1 and FOXL2 act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation." BMC Dev Biol **8**: 36.
- Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D. and Page, D. C.** (2006). "Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2474-9.
- Kudo, T. and Sutou, S.** (1997). "Molecular cloning of chicken FTZ-F1-related orphan receptors." Gene **197**(1-2): 261-8.
- Kuroda, Y., Arai, N., Arita, M., Teranishi, M., Hori, T., Harata, M. and Mizuno, S.** (2001). "Absence of Z-chromosome inactivation for five genes in male chickens." Chromosome Res **9**(6): 457-68.
- Kuwana, T. and Rogulska, T.** (1999). "Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **45**(5): 725-36.
- Kwon, J. Y., Haghpanah, V., Kogson-Hurtado, L. M., McAndrew, B. J. and Penman, D. J.** (2000). "Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation." J Exp Zool **287**(1): 46-53.
- Lalli, E. and Sassone-Corsi, P.** (2003). "DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation." Mol Endocrinol **17**(8): 1445-53.
- Larrain, J., Bachiller, D., Lu, B., Agius, E., Piccolo, S. and De Robertis, E. M.** (2000). "BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space." Development **127**(4): 821-30.
- Law, A. S., Burt, D. W. and Armstrong, D. G.** (1995). "Expression of transforming growth factor-beta mRNA in chicken ovarian follicular tissue." Gen Comp Endocrinol **98**(3): 227-33.
- Lawrence, D. A.** (1996). "Transforming growth factor-beta: a general review." Eur Cytokine Netw **7**(3): 363-74.

- Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P. and Hogan, B. L.** (1999). "Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo." Genes Dev **13**(4): 424-36.
- Lee, W. S., Otsuka, F., Moore, R. K. and Shimasaki, S.** (2001). "Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat." Biol Reprod **65**(4): 994-9.
- Lerner, A. A., Salamone, D. F., Chiappe, M. E. and Baranao, J. L.** (1995). "Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors." J Cell Physiol **164**(2): 395-403.
- Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M. and Vale, W.** (2000). "Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling." Nature **404**(6776): 411-4.
- Li, R., Phillips, D. M. and Mather, J. P.** (1995). "Activin promotes ovarian follicle development in vitro." Endocrinology **136**(3): 849-56.
- Li, X., Nokkala, E., Yan, W., Streng, T., Saarinen, N., Warri, A., Huhtaniemi, I., Santti, R., Makela, S. and Poutanen, M.** (2001). "Altered structure and function of reproductive organs in transgenic male mice overexpressing human aromatase." Endocrinology **142**(6): 2435-42.
- Lin, M., Thorne, M. H., Martin, I. C., Sheldon, B. L. and Jones, R. C.** (1995). "Development of the gonads in the triploid (ZZW and ZZZ) fowl, *Gallus domesticus*, and comparison with normal diploid males (ZZ) and females (ZW)." Reprod Fertil Dev **7**(5): 1185-97.
- Lin, S. J., Lerch, T. F., Cook, R. W., Jardetzky, T. S. and Woodruff, T. K.** (2006). "The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding." Reproduction **132**(2): 179-90.
- Liu, X., Andoh, K., Abe, Y., Kobayashi, J., Yamada, K., Mizunuma, H. and Ibuki, Y.** (1999). "A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice." Endocrinology **140**(6): 2480-5.
- Loffler, K. A., Zarkower, D. and Koopman, P.** (2003). "Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development." Endocrinology **144**(7): 3237-43.
- Lopez-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S. and Massague, J.** (1991). "Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system." Cell **67**(4): 785-95.

- Lovell, T. M., Knight, P. G., Groome, N. P. and Gladwell, R. T.** (2000). "Measurement of dimeric inhibins and effects of active immunization against inhibin alpha-subunit on plasma hormones and testis morphology in the developing cockerel." Biol Reprod **63**(1): 213-21.
- Lovell, T. M., Knight, P. G., Groome, N. P. and Gladwell, R. T.** (2001). "Changes in plasma inhibin A levels during sexual maturation in the female chicken and the effects of active immunization against inhibin alpha-subunit on reproductive hormone profiles and ovarian function." Biol Reprod **64**(1): 188-96.
- Ludbrook, L. M. and Harley, V. R.** (2004). "Sex determination: a 'window' of DAX1 activity." Trends Endocrinol Metab **15**(3): 116-21.
- Lui, W. Y., Lee, W. M. and Cheng, C. Y.** (2001). "Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11." Endocrinology **142**(5): 1865-77.
- Lui, W. Y., Lee, W. M. and Cheng, C. Y.** (2003a). "TGF-betas: their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics." Int J Androl **26**(3): 147-60.
- Lui, W. Y., Wong, C. H., Mruk, D. D. and Cheng, C. Y.** (2003b). "TGF-beta3 regulates the blood-testis barrier dynamics via the p38 mitogen activated protein (MAP) kinase pathway: an in vivo study." Endocrinology **144**(4): 1139-42.
- Luo, X., Ikeda, Y. and Parker, K. L.** (1994). "A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation." Cell **77**(4): 481-90.
- Lynch, J. P., Lala, D. S., Peluso, J. J., Luo, W., Parker, K. L. and White, B. A.** (1993). "Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues." Mol Endocrinol **7**(6): 776-86.
- Maclaughlin, D. T., Hutson, J. M. and Donahoe, P. K.** (1983). "Specific Estradiol Binding in Embryonic Mullerian Ducts: A Potential Modulator of Regression in the Male and Female Chick." Endocrinology **113**(1): 141-145.
- Magoffin, D. A., Hubert-Leslie, D. and Zachow, R. J.** (1995). "Estradiol-17 beta, insulin-like growth factor-I, and luteinizing hormone inhibit secretion of transforming growth factor beta by rat ovarian theca-interstitial cells." Biol Reprod **53**(3): 627-35.
- Majdic, G. and Saunders, P. T.** (1996). "Differential patterns of expression of DAX-1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) in the fetal rat testis." Endocrinology **137**(8): 3586-9.
- Maraud, R., Vergnaud, O. and Rashedi, M.** (1990). "New insights on the mechanism of testis differentiation from the morphogenesis of experimentally induced testes in genetically female chick embryos." Am J Anat **188**(4): 429-37.
- Marin, I., Siegal, M. L. and Baker, B. S.** (2000). "The evolution of dosage-compensation mechanisms." Bioessays **22**(12): 1106-14.

- Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R. and Capel, B.** (1997). "Male-specific cell migration into the developing gonad." Curr Biol **7**(12): 958-68.
- Maseki, Y., Nakamura, K., Iwasawa, A., Zheng, J., Inoue, K. and Sakai, T.** (2004). "Development of gonadotropes in the chicken embryonic pituitary gland." Zoolog Sci **21**(4): 435-44.
- Massague, J.** (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-91.
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D.** (2005). "Smad transcription factors." Genes Dev **19**(23): 2783-810.
- Mather, J. P., Attie, K. M., Woodruff, T. K., Rice, G. C. and Phillips, D. M.** (1990). "Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis." Endocrinology **127**(6): 3206-14.
- Mauleon, P., BEZARD, J. and TERQUI, M.** (1977). "Very early and transient 17 B-estradiol secretion by fetal sheep ovary. In vitro study." Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. **17**(3A): 399-401.
- Mazaud, S., Oreal, E., Guigon, C. J., Carre-Eusebe, D. and Magre, S.** (2002). "Lhx9 expression during gonadal morphogenesis as related to the state of cell differentiation." Gene Expr Patterns **2**(3-4): 373-7.
- McCarrey, J. R. and Abbott, U. K.** (1978). "Chick gonad differentiation following excision of primordial germ cells." Dev Biol **66**(1): 256-65.
- McCarrey, J. R. and Abbott, U. K.** (1982). "Functional differentiation of chick gonads following depletion of primordial germ cells." J Embryol Exp Morphol **68**: 161-74.
- McGrath, S. A., Esquela, A. F. and Lee, S. J.** (1995). "Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9." Mol Endocrinol **9**(1): 131-6.
- McLaren, A.** (1988). "Somatic and germ-cell sex in mammals." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **322**(1208): 3-9.
- McLaren, A.** (2003). "Primordial germ cells in the mouse." Dev Biol **262**(1): 1-15.
- McLaren, A. and Southee, D.** (1997). "Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis." Dev Biol **187**(1): 107-13.
- McNatty, K. P., Fidler, A. E., Juengel, J. L., Quirke, L. D., Smith, P. R., Heath, D. A., Lundy, T., O'Connell, A. and Tisdall, D. J.** (2000). "Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function." Mol Cell Endocrinol **163**(1-2): 11-20.
- McNatty, K. P., Heath, D. A., Lundy, T., Fidler, A. E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N. and Tisdall, D. J.** (1999). "Control of early ovarian follicular development." J Reprod Fertil Suppl **54**: 3-16.



**McNatty, K. P., Juengel, J. L., Reader, K. L., Lun, S., Myllymaa, S., Lawrence, S. B., Western, A., Meerasahib, M. F., Mottershead, D. G., Groome, N. P., Ritvos, O. and Laitinen, M. P.** (2005a). "Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function." Reproduction **129**(4): 473-80.

**McNatty, K. P., Juengel, J. L., Reader, K. L., Lun, S., Myllymaa, S., Lawrence, S. B., Western, A., Meerasahib, M. F., Mottershead, D. G., Groome, N. P., Ritvos, O. and Laitinen, M. P.** (2005b). "Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants." Reproduction **129**(4): 481-7.

**McQueen, H. A. and Clinton, M.** (2009). "Avian sex chromosomes: dosage compensation matters." Chromosome Res **17**(5): 687-97.

**McQueen, H. A., McBride, D., Miele, G., Bird, A. P. and Clinton, M.** (2001). "Dosage compensation in birds." Curr Biol **11**(4): 253-7.

**Meehan, T., Schlatt, S., O'Bryan, M. K., de Kretser, D. M. and Loveland, K. L.** (2000). "Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH." Dev Biol **220**(2): 225-37.

**Mendez, C., Alcantara, L., Escalona, R., Lopez-Casillas, F. and Pedernera, E.** (2006). "Transforming growth factor beta inhibits proliferation of somatic cells without influencing germ cell number in the chicken embryonic ovary." Cell Tissue Res **325**(1): 143-9.

**Mendez, C., Carrasco, E. and Pedernera, E.** (2005). "Adenohypophysis regulates cell proliferation in the gonads of the developing chick embryo." J Exp Zool A Comp Exp Biol **303**(3): 179-85.

**Mendez-Herrera, M. C., Tamez, L., Candido, A., Reyes-Esparza, J. A. and Pedernera, E.** (1998). "Follicle stimulating hormone increases somatic and germ cell number in the ovary during chick embryo development." Gen Comp Endocrinol **111**(2): 207-15.

**Merchant-Larios, H. and Moreno-Mendoza, N.** (1998). "Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis." Exp Cell Res **244**(1): 230-8.

**Merchant-Larios, L. P. a. M. R.-B.** (1984). "Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros." Dev. Growth Diff. **26**: 403-417.

**Miro, F. and Hillier, S. G.** (1996). "Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin." Endocrinology **137**(2): 464-8.

**Miyoshi, T., Otsuka, F., Inagaki, K., Otani, H., Takeda, M., Suzuki, J., Goto, J., Ogura, T. and Makino, H.** (2007). "Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone-induced estrogen production." Endocrinology **148**(1): 337-45.

- Mizutani, T., Minegishi, T., Nonobe, Y., Abe, Y., Hasegawa, Y., Wakabayashi, K., Kamiyoshi, M. and Miyamoto, K.** (1998). "Molecular cloning and functional expression of chicken luteinizing hormone receptor." Biochim Biophys Acta **1397**(1): 1-8.
- Moniot, B., Berta, P., Scherer, G., Sudbeck, P. and Poulat, F.** (2000). "Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination." Mech Dev **91**(1-2): 323-5.
- Monniaux, D., Huet, C., Besnard, N., Clement, F., Bosc, M., Pisselet, C., Monget, P. and Mariana, J. C.** (1997). "Follicular growth and ovarian dynamics in mammals." J Reprod Fertil Suppl **51**: 3-23.
- Montgomery, G. W., Galloway, S. M., Davis, G. H. and McNatty, K. P.** (2001). "Genes controlling ovulation rate in sheep." Reproduction **121**(6): 843-52.
- Moore, R. K., Otsuka, F. and Shimasaki, S.** (2001). "Role of ERK1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells." Biochem Biophys Res Commun **289**(4): 796-800.
- Moore, R. K., Otsuka, F. and Shimasaki, S.** (2003). "Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells." J Biol Chem **278**(1): 304-10.
- Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H. and Omura, T.** (1992). "A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s." J Biol Chem **267**(25): 17913-9.
- Munsterberg, A. and Lovell-Badge, R.** (1991). "Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation." Development **113**(2): 613-24.
- Muscatelli, F., Strom, T. M., Walker, A. P., Zanaria, E., Recan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl, W. and et al.** (1994). "Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism." Nature **372**(6507): 672-6.
- Nachtigal, M. W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D. L., Flanagan, J. N., Hammer, G. D. and Ingraham, H. A.** (1998). "Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression." Cell **93**(3): 445-54.
- Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T. and Mizuno, S.** (1998). "Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos." J Mol Endocrinol **20**(2): 193-202.
- Nakamura, M.** (2009). "Sex determination in amphibians." Semin Cell Dev Biol **20**(3): 271-82.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.-T. and Nagahama, Y.** (1998). "Gonadal sex differentiation in teleost fish." Journal of Experimental Zoology **281**(5): 362-372.

- Nakamura, M., Kuwana, T., Miyayama, Y. and Fujimoto, T.** (1988). "Extragenital distribution of primordial germ cells in the early chick embryo." Anat Rec **222**(1): 90-4.
- Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Usui, F., Mushika, T., Ono, T., Setioko, A. R., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T.** (2007). "Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo." Poult Sci **86**(10): 2182-93.
- Nam, J. S., Turcotte, T. J., Smith, P. F., Choi, S. and Yoon, J. K.** (2006). "Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression." J Biol Chem **281**(19): 13247-57.
- Newbold, R. R., Suzuki, Y. and McLachlan, J. A.** (1984). "Mullerian duct maintenance in heterotypic organ culture after in vivo exposure to diethylstilbestrol." Endocrinology **115**(5): 1863-8.
- Nishikimi, H., Kansaku, N., Saito, N., Usami, M., Ohno, Y. and Shimada, K.** (2000). "Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken." Mol Reprod Dev **55**(1): 20-30.
- Nishino, K., Yamanouchi, K., Naito, K. and Tojo, H.** (2001). "Characterization of mesonephric cells that migrate into the XY gonad during testis differentiation." Exp Cell Res **267**(2): 225-32.
- Noce, T., Ando, H., Ueda, T., Kubokawa, K., Higashinakagawa, T. and Ishii, S.** (1989). "Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the putative cDNA for the precursor molecule of the chicken LH-beta subunit." J Mol Endocrinol **3**(2): 129-37.
- Nomura, O., Nakabayashi, O., Nishimori, K., Yasue, H. and Mizuno, S.** (1999). "Expression of five steroidogenic genes including aromatase gene at early developmental stages of chicken male and female embryos." J Steroid Biochem Mol Biol **71**(3-4): 103-9.
- Norris, D. O.** (1985). *Vertebrates endocrinology*. Philadelphia, Lea & Febiger, : 484-488
- O, W. S., Short, R. V., Renfree, M. B. and Shaw, G.** (1988). "Primary genetic control of somatic sexual differentiation in a mammal." Nature **331**(6158): 716-7.
- Ohnishi, J., Ohnishi, E., Shibuya, H. and Takahashi, T.** (2005). "Functions for proteinases in the ovulatory process." Biochim Biophys Acta **1751**(1): 95-109.
- Olaso, R., Pairault, C., Boulogne, B., Durand, P. and Habert, R.** (1998). "Transforming growth factor beta1 and beta2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis." Endocrinology **139**(2): 733-40.
- Onagbesan, O., Bruggeman, V. and Decuypere, E.** (2009). "Intra-ovarian growth factors regulating ovarian function in avian species: a review." Anim Reprod Sci **111**(2-4): 121-40.
- Onagbesan, O. M., Bruggeman, V., Van As, P., Tona, K., Williams, J. and Decuypere, E.** (2003). "BMPs and BMPRs in chicken ovary and effects of BMP-4 and -7 on granulosa cell

proliferation and progesterone production in vitro." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(5): E973-83.

**Onagbesan, O. M., Safi, M., Decuypere, E. and Bruggeman, V.** (2004). "Developmental changes in inhibin alpha and inhibin/activin betaA and betaB mRNA levels in the gonads during post-hatch prepubertal development of male and female chickens." Mol Reprod Dev **68**(3): 319-26.

**O'Neill, M., Binder, M., Smith, C., Andrews, J., Reed, K., Smith, M., Millar, C., Lambert, D. and Sinclair, A.** (2000). "ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad." Dev Genes Evol **210**(5): 243-9.

**Oreal, E., Mazaud, S., Picard, J. Y., Magre, S. and Carre-Eusebe, D.** (2002). "Different patterns of anti-Mullerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads." Dev Dyn **225**(3): 221-32.

**Oreal, E., Pieau, C., Mattei, M. G., Josso, N., Picard, J. Y., Carre-Eusebe, D. and Magre, S.** (1998). "Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression." Dev Dyn **212**(4): 522-32.

**Otsuka, F., Moore, R. K. and Shimasaki, S.** (2001a). "Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary." J Biol Chem **276**(35): 32889-95.

**Otsuka, F., Yamamoto, S., Erickson, G. F. and Shimasaki, S.** (2001b). "Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression." J Biol Chem **276**(14): 11387-92.

**Pace, H. C. and Brenner, C.** (2003). "Feminizing chicks: a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme activity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer." Genome Biol **4**(3): R18.

**Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Servel, N., Taourit, S., Furet, J. P., Fellous, M., Grosclaude, F., Cribiu, E. P., Cotinot, C. and Vaiman, D.** (2001). "A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats." Nat Genet **29**(4): 453-8.

**Pailhoux, E., Vigier, B., Vaiman, D., Servel, N., Chaffaux, S., Cribiu, E. P. and Cotinot, C.** (2002). "Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats." Dev Dyn **224**(1): 39-50.

**Pannetier, M., Fabre, S., Batista, F., Kocer, A., Renault, L., Jolivet, G., Mandon-Pepin, B., Cotinot, C., Veitia, R. and Pailhoux, E.** (2006). "FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development." J Mol Endocrinol **36**(3): 399-413.

**Pannetier, M., Renault, L., Jolivet, G., Cotinot, C. and Pailhoux, E.** (2005). "Ovarian-specific expression of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by a FOXL2 bidirectional promoter." Genomics **85**(6): 715-26.

- Parker, K. L. and Schimmer, B. P.** (1997). "Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function." Endocr Rev **18**(3): 361-77.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M. C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A. and Camerino, G.** (2006). "R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy." Nat Genet **38**(11): 1304-9.
- Patek, C. E., Kerr, J. B., Gosden, R. G., Jones, K. W., Hardy, K., Muggleton-Harris, A. L., Handyside, A. H., Whittingham, D. G. and Hooper, M. L.** (1991). "Sex chimaerism, fertility and sex determination in the mouse." Development **113**(1): 311-25.
- Payen, E., Pailhoux, E., Abou Merhi, R., Gianquinto, L., Kirszenbaum, M., Locatelli, A. and Cotinot, C.** (1996). "Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation." Int J Dev Biol **40**(3): 567-75.
- Pedernera, E., Solis, L., Peralta, I. and Velazquez, P. N.** (1999). "Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development." Gen Comp Endocrinol **116**(2): 213-20.
- Peluso, J. J., Pappalardo, A. and White, B. A.** (1993). "Control of rat granulosa cell mitosis by phorbol ester-, cyclic AMP-, and estradiol-17 beta-dependent pathways." Biol Reprod **49**(2): 416-22.
- Peralta, I., Romano, M. C. and Velazquez, P. N.** (2004). "Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone on cultured chick embryo testis cells." Poult Sci **83**(7): 1193-8.
- Peralta, I., Romano, M. C. and Velazquez, P. N.** (2009). "Signaling pathways involved in the effect of follicle-stimulating hormone on chick embryo testis cell proliferation." Poult Sci **88**(2): 380-6.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). "Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4." Cell **86**(4): 589-98.
- Pieau, C.** (1996). "Temperature variation and sex determination in reptiles." Bioessays **18**: 19-26.
- Pieau, C., Dorizzi, M. and Richard-Mercier, N.** (2001). "Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles." Exs(91): 117-41.
- Pierce, J. G. and Parsons, T. F.** (1981). "Glycoprotein hormones: structure and function." Annu Rev Biochem **50**: 465-95.
- Pierre, A., Pisselet, C., Dupont, J., Mandon-Pepin, B., Monniaux, D., Monget, P. and Fabre, S.** (2004). "Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells." J Mol Endocrinol **33**(3): 805-17.

- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N. and Filipowicz, W.** (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" Trends Cell Biol **17**(3): 118-26.
- Pisarska, M. D., Bae, J., Klein, C. and Hsueh, A. J.** (2004). "Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene." Endocrinology **145**(7): 3424-33.
- Proudman, J. A., Vandesande, F. and Berghman, L. R.** (1999). "Immunohistochemical evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone reside in separate cells in the chicken pituitary." Biol Reprod **60**(6): 1324-8.
- Puebla-Osorio, N., Proudman, J. A., Compton, A. E., Clements, K. E., Decuypere, E., Vandesande, F. and Berghman, L. R.** (2002). "FSH- and LH-cells originate as separate cell populations and at different embryonic stages in the chicken embryo." Gen Comp Endocrinol **127**(3): 242-8.
- Qin, Y. and Bishop, C. E.** (2005). "Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry." Hum Mol Genet **14**(9): 1221-9.
- Quirke, L. D., Juengel, J. L., Tisdall, D. J., Lun, S., Heath, D. A. and McNatty, K. P.** (2001). "Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad." Biol Reprod **65**(1): 216-28.
- Racine, C., Rey, R., Forest, M. G., Louis, F., Ferre, A., Huhtaniemi, I., Josso, N. and di Clemente, N.** (1998). "Receptors for anti-mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 594-9.
- Rashedi, M., Maraud, R. and Stoll, R.** (1983). "Development of the testes in female domestic fowls submitted to an experimental sex reversal during embryonic life." Biol Reprod **29**(5): 1221-7.
- Raymond, C. S., Kettlewell, J. R., Hirsch, B., Bardwell, V. J. and Zarkower, D.** (1999). "Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development." Dev Biol **215**(2): 208-20.
- Raymond, C. S., Murphy, M. W., O'Sullivan, M. G., Bardwell, V. J. and Zarkower, D.** (2000). "Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation." Genes Dev **14**(20): 2587-95.
- Raymond, C. S., Shamu, C. E., Shen, M. M., Seifert, K. J., Hirsch, B., Hodgkin, J. and Zarkower, D.** (1998). "Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes." Nature **391**(6668): 691-5.
- Rebecchi, L., Guidi, A. and Bertolani, R.** (2000). "Maturative pattern of the ovotestis in two hermaphrodite species of eutardigrades." Invertebrate Reproduction & Development **37**(1): 25-34.

**Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D. and Izaurralde, E.** (2005). "A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing." Rna **11**(11): 1640-7.

**Renfree, M. B. and Short, R. V.** (1988). "Sex determination in marsupials: evidence for a marsupial-eutherian dichotomy." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **322**(1208): 41-53.

**Rey, R., Lordereau-Richard, I., Carel, J. C., Barbet, P., Cate, R. L., Roger, M., Chaussain, J. L. and Josso, N.** (1993). "Anti-mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development." J Clin Endocrinol Metab **77**(5): 1220-6.

**Richards, J. S. and Kersey, K. A.** (1979). "Changes in theca and granulosa cell function in antral follicles developing during pregnancy in the rat: gonadotropin receptors, cyclic AMP and estradiol-17 beta." Biol Reprod **21**(5): 1185-201.

**Roberts, A. J. and Skinner, M. K.** (1991). "Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development." Endocrinology **129**(4): 2041-8.

**Rodemer, A. I. a. H. W.** (1986). "Gonadal development of the chick embryo following microsurgically caused agenesis of the mesonephros and using interspecific quail-chick chimeras." J. Embryol. Exp. Morphol. **98**: 269-285.

**Rodemer, E. S., Ihmer, A. and Wartenberg, H.** (1986). "Gonadal development of the chick embryo following microsurgically caused agenesis of the mesonephros and using interspecific quail-chick chimaeras." J Embryol Exp Morphol **98**: 269-85.

**Rogler, C. E., Levoci, L., Ader, T., Massimi, A., Tchaikovskaya, T., Norel, R. and Rogler, L. E.** (2009). "MicroRNA-23b cluster microRNAs regulate transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signaling and liver stem cell differentiation by targeting Smads." Hepatology **50**(2): 575-84.

**Romanoff** (1960). *the avian embryo: structural and functionnal development*. New York, Macmillan Ltd.: 816-853

**Rombauts, L., Berghman, L. R., Vanmontfort, D., Decuypere, E. and Verhoeven, G.** (1993). "Changes in immunoreactive FSH and inhibin in developing chicken embryos and the effects of estradiol and the aromatase inhibitor R76713." Biol Reprod **49**(3): 549-54.

**Rombauts, L., Vanmontfort, D., Decuypere, E. and Verhoeven, G.** (1996). "Inhibin and activin have antagonistic paracrine effects on gonadal steroidogenesis during the development of the chicken embryo." Biol Reprod **54**(6): 1229-37.

**Safi, M., Onagbesan, O. M., Volckaert, G., Vanmontfort, D., Bruggeman, V. and Decuypere, E.** (2001). "Developmental expression of activin/inhibin alpha- and beta(A)-subunit genes in the gonads of male and female chick embryos." Gen Comp Endocrinol **122**(3): 304-11.

- Sanchez-Bringas, G., Salazar, O., Pedernera, E. and Mendez, C.** (2006). "Follicle-stimulating hormone treatment reverses the effect of hypophysectomy on cell proliferation in the chicken embryo ovary." Gen Comp Endocrinol **149**(2): 134-40.
- Sandhoff, T. W., Hales, D. B., Hales, K. H. and McLean, M. P.** (1998). "Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1." Endocrinology **139**(12): 4820-31.
- Scheib, D.** (1983). "Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation." Differentiation **23 Suppl**: S87-92.
- Scheib, D., Guichard, A., Mignot, T. M. and Cedard, L.** (1981). "Steroidogenesis by gonads of normal and of diethylstilbestrol-treated quail embryos: radioimmunoassays on organ cultures." Gen Comp Endocrinol **43**(4): 519-26.
- Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A. C. and Treier, M.** (2004). "The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance." Development **131**(4): 933-42.
- Sekido, R. and Lovell-Badge, R.** (2007). "Mechanisms of gonadal morphogenesis are not conserved between chick and mouse." Dev Biol **302**(1): 132-42.
- Shen, S. T. and Yu, J. Y.** (2002). "Cloning and gene expression of a cDNA for the chicken follicle-stimulating hormone (FSH)-beta-subunit." Gen Comp Endocrinol **125**(3): 375-86.
- Shen, W. H., Moore, C. C., Ikeda, Y., Parker, K. L. and Ingraham, H. A.** (1994). "Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade." Cell **77**(5): 651-61.
- Shi, Y. and Massague, J.** (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell **113**(6): 685-700.
- Shimasaki, S., Zachow, R. J., Li, D., Kim, H., Iemura, S., Ueno, N., Sampath, K., Chang, R. J. and Erickson, G. F.** (1999). "A functional bone morphogenetic protein system in the ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7282-7.
- Shoemaker, C. M., Queen, J. and Crews, D.** (2007). "Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination." Mol Endocrinol **21**(11): 2750-63.
- Siddall, M. E.** (2004). "Invertebrates.--R.C. Brusca and G. J. Brusca. 2003. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts." Syst Biol **53**(4): 664-666.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N.** (1990). "A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif." Nature **346**(6281): 240-4.



**Skinner, M. K., Keski-Oja, J., Osteen, K. G. and Moses, H. L.** (1987). "Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth." Endocrinology **121**(2): 786-92.

**Small, C. L., Shima, J. E., Uzumcu, M., Skinner, M. K. and Griswold, M. D.** (2005). "Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad." Biol Reprod **72**(2): 492-501.

**Smith, C. A., Andrews, J. E. and Sinclair, A. H.** (1997). "Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes." J Steroid Biochem Mol Biol **60**(5-6): 295-302.

**Smith, C. A., Clifford, V., Western, P. S., Wilcox, S. A., Bell, K. S. and Sinclair, A. H.** (2000). "Cloning and expression of a DAX1 homologue in the chicken embryo." J Mol Endocrinol **24**(1): 23-32.

**Smith, C. A., Katz, M. and Sinclair, A. H.** (2003). "DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos." Biol Reprod **68**(2): 560-70.

**Smith, C. A., McClive, P. J., Hudson, Q. and Sinclair, A. H.** (2005). "Male-specific cell migration into the developing gonad is a conserved process involving PDGF signalling." Dev Biol **284**(2): 337-50.

**Smith, C. A., McClive, P. J., Western, P. S., Reed, K. J. and Sinclair, A. H.** (1999a). "Conservation of a sex-determining gene." Nature **402**(6762): 601-2.

**Smith, C. A., Roeszler, K. N., Bowles, J., Koopman, P. and Sinclair, A. H.** (2008a). "Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid." BMC Dev Biol **8**: 85.

**Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J. and Sinclair, A. H.** (2009a). "The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken." Nature **461**(7261): 267-71.

**Smith, C. A., Roeszler, K. N. and Sinclair, A. H.** (2009b). "Genetic evidence against a role for W-linked histidine triad nucleotide binding protein (HINTW) in avian sex determination." Int J Dev Biol **53**(1): 59-67.

**Smith, C. A., Shoemaker, C. M., Roeszler, K. N., Queen, J., Crews, D. and Sinclair, A. H.** (2008b). "Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development." BMC Dev Biol **8**: 72.

**Smith, C. A., Smith, M. J. and Sinclair, A. H.** (1999b). "Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation." Gen Comp Endocrinol **113**(2): 187-96.

**Smitz, J., Cortvrindt, R., Hu, Y. and Vanderstichele, H.** (1998). "Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles." Mol Reprod Dev **50**(3): 294-304.

- Souza, C. J., Campbell, B. K., McNeilly, A. S. and Baird, D. T.** (2002). "Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry." Reproduction **123**(3): 363-9.
- Stahl, A. and Carlon, N.** (1973). "[Morphogenesis of the sex cords and the significance of the medullary zone of the gonad in the chick embryo]." Acta Anat (Basel) **85**(2): 248-74.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. and McMahon, A. P.** (1994). "Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4." Nature **372**(6507): 679-83.
- Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G. and Lovell-Badge, R.** (1998). "Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination." Nature **391**(6669): 761-7.
- Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R. and Camerino, G.** (1996). "Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function." Nat Genet **12**(4): 404-9.
- Swift, C. H.** (1915). "Origin of the definitive sex-cells in the female chick and their relation to the primordial germ-cells." Am. J. Anat. **18**: 375-410.
- Swift, C. H.** (1916). "Origin of the sex-cords and definitive spermatogonia in the male chick." Am. J. Anat. **20**: 375-410.
- Swindell, E. C., Thaller, C., Sockanathan, S., Petkovich, M., Jessell, T. M. and Eichele, G.** (1999). "Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo." Dev Biol **216**(1): 282-96.
- Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A. and Nishimune, Y.** (2002). "Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway." Mech Dev **113**(1): 29-39.
- Tagami, T. and Kagami, H.** (1998). "Developmental origin of avian primordial germ cells and its unique differentiation in the gonads of mixed-sex chimeras." Mol Reprod Dev **50**(3): 370-6.
- Tager, H. S. and Steiner, D. F.** (1974). "Peptide hormones." Annu Rev Biochem **43**(0): 509-38.
- Takada, S., Mano, H. and Koopman, P.** (2005). "Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads." Cell Mol Life Sci **62**(18): 2140-6.
- Tanabe, Y., Saito, N. and Nakamura, T.** (1986). "Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*)." Gen Comp Endocrinol **63**(3): 456-63.

**ten Dijke, P., Miyazono, K. and Heldin, C. H.** (2000). "Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling." Trends Biochem Sci **25**(2): 64-70.

**Teng, C. S., Wang, J. J. and Teng, J. I.** (1987). "Purification of chicken testicular mullerian inhibiting substance by ion exchange and high-performance liquid chromatography." Dev Biol **123**(1): 245-54.

**Teng, C. T. and Teng, C. S.** (1977). "Studies on sex-organ development. The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in embryonic-chick ovary." Biochem J **162**(1): 123-34.

**Teng, C. T., Teng, C. S., Bousfield, G. R., Liu, W. K. and Ward, D. N.** (1982). "Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones." Gen Comp Endocrinol **48**(3): 325-32.

**Teranishi, M., Shimada, Y., Hori, T., Nakabayashi, O., Kikuchi, T., Macleod, T., Pym, R., Sheldon, B., Solovei, I., Macgregor, H. and Mizuno, S.** (2001). "Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus." Chromosome Res **9**(2): 147-65.

**Thompson, T. B., Lerch, T. F., Cook, R. W., Woodruff, T. K. and Jardtetzky, T. S.** (2005). "The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding." Dev Cell **9**(4): 535-43.

**Thorne, M. H.** (1995). Genetics of poultry reproduction Poultry production. H. P. Amsterdam, Elsevier: 411-434

**Thorne, M. H., Nicholas, F. W., Moran, C. and Sheldon, B. L.** (1997). "Genetic analysis of triploidy in a selected line of chickens." J Hered **88**(6): 495-8.

**Thorne, M. H. and Sheldon, B. L.** (1991). "Cytological evidence of maternal meiotic errors in a line of chickens with a high incidence of triploidy." Cytogenet Cell Genet **57**(4): 206-10.

**Tilmann, C. and Capel, B.** (1999). "Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad." Development **126**(13): 2883-90.

**Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., Yoshitome, A., Yamawaki, K., Amagai, M., Inoue, A., Oshima, T. and Kakitani, M.** (2008). "R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling." Hum Mol Genet **17**(9): 1278-91.

**Tremblay, J. J., Robert, N. M. and Viger, R. S.** (2001). "Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells." Mol Endocrinol **15**(9): 1636-50.

**Ukeshima, A. and Fujimoto, T.** (1991). "A fine morphological study of germ cells in asymmetrically developing right and left ovaries of the chick." Anat Rec **230**(3): 378-86.

- Urbatzka, R., Lorenz, C., Lutz, I. and Kloas, W.** (2010). "Expression profiles of LHbeta, FSHbeta and their gonadal receptor mRNAs during sexual differentiation of *Xenopus laevis* tadpoles." Gen Comp Endocrinol **168**(2): 239-44.
- Vaillant, S., Dorizzi, M., Pieau, C. and Richard-Mercier, N.** (2001a). "Sex reversal and aromatase in chicken." J Exp Zool **290**(7): 727-40.
- Vaillant, S., Guemene, D., Dorizzi, M., Pieau, C., Richard-Mercier, N. and Brillard, J. P.** (2003). "Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (*Gallus domesticus*) treated with Fadrozole." Mol Reprod Dev **65**(4): 420-8.
- Vaillant, S., Magre, S., Dorizzi, M., Pieau, C. and Richard-Mercier, N.** (2001b). "Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor." Dev Dyn **222**(2): 228-37.
- Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N. and McMahon, A. P.** (1999). "Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling." Nature **397**(6718): 405-9.
- van Dissel-Emiliani, F. M., Grootenhuis, A. J., de Jong, F. H. and de Rooij, D. G.** (1989). "Inhibin reduces spermatogonial numbers in testes of adult mice and Chinese hamsters." Endocrinology **125**(4): 1899-903.
- Van Limborgh, J.** (1968). "[The first sign of sexual differentiation of the gonads in chick embryos]." Arch Anat Microsc Morphol Exp **57**(1): 79-90.
- van Tienhoven, A.** (1983). *Reproductive Physiology of vertebrates*. Ithaca, Cornell Univ-Press
- Velazquez, P. N., Peralta, I. and Pedernera, E.** (1997). "Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo." Gen Comp Endocrinol **105**(1): 40-9.
- Vidal, V. P., Chaboissier, M. C., de Rooij, D. G. and Schedl, A.** (2001). "Sox9 induces testis development in XX transgenic mice." Nat Genet **28**(3): 216-7.
- Villalpando, I., Sanchez-Bringas, G., Sanchez-Vargas, I., Pedernera, E. and Villafan-Monroy, H.** (2000). "The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick." Gen Comp Endocrinol **117**(3): 325-34.
- Visser, J. A. and Themmen, A. P.** (2005). "Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis." Mol Cell Endocrinol **234**(1-2): 81-6.
- Vitt, U. A., Hayashi, M., Klein, C. and Hsueh, A. J.** (2000). "Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles." Biol Reprod **62**(2): 370-7.

**Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E. and et al.** (1994). "Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9." Cell **79**(6): 1111-20.

**Wakabayashi, N., Suzuki, A., Hoshino, H., Nishimori, K. and Mizuno, S.** (1997). "The cDNA cloning and transient expression of a chicken gene encoding a follicle-stimulating hormone receptor." Gene **197**(1-2): 121-7.

**Wandji, S. A., Fortier, M. A. and Sirard, M. A.** (1992). "Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle." Biol Reprod **46**(6): 1034-41.

**Wang, D., Kobayashi, T., Zhou, L. and Nagahama, Y.** (2004). "Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*." Biochem Biophys Res Commun **320**(1): 83-9.

**Wang, D. S., Kobayashi, T., Zhou, L. Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K. and Nagahama, Y.** (2007). "Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1." Mol Endocrinol **21**(3): 712-25.

**Wartenberg, H., Lenz, E. and Schweikert, H. U.** (1992). "Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo." Andrologia **24**(1): 1-6.

**Wells, R. G., Gilboa, L., Sun, Y., Liu, X., Henis, Y. I. and Lodish, H. F.** (1999). "Transforming growth factor-beta induces formation of a dithiothreitol-resistant type I/Type II receptor complex in live cells." J Biol Chem **274**(9): 5716-22.

**Weniger, J. P., Chouraqui, J. and Zeis, A.** (1989a). "17 beta-estradiol secretion in normal and hypophysectomized chick embryos." Reprod Nutr Dev **29**(1): 89-93.

**Weniger, J. P., Chouraqui, J. and Zeis, A.** (1989b). "[Hypophysis and estradiol secretion in the chick embryo]." C R Acad Sci III **308**(20): 531-6.

**Weniger, J. P., Chouraqui, J. and Zeis, A.** (1990). "Pituitary control of estrogen secretion in the chick embryo: true or spurious?" Gen Comp Endocrinol **79**(3): 346-50.

**Weniger, J. P. and Zeis, A.** (1971). "[Biosynthesis of estrogens by chick gonadal rudiments]." Gen Comp Endocrinol **16**(2): 391-5.

**Weniger, J. P. and Zeis, A.** (1987). "17 Beta-estradiol secretion by the ovary of the hypophysectomized chick embryo." Gen Comp Endocrinol **65**(1): 9-11.

**Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J. A. and Sinclair, A. H.** (1999a). "Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression." Dev Dyn **216**(4-5): 411-9.

**Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J. A. and Sinclair, A. H.** (1999b). "Temperature-dependent sex determination: upregulation of SOX9 expression after commitment to male development." Dev Dyn **214**(3): 171-7.

**Western, P. S., Harry, J. L., Marshall Graves, J. A. and Sinclair, A. H.** (2000). "Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis." Gene **241**(2): 223-32.

**Western, P. S. and Sinclair, A. H.** (2001). "Sex, genes, and heat: triggers of diversity." J Exp Zool **290**(6): 624-31.

**Wiater, E. and Vale, W.** (2003). "Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling." J Biol Chem **278**(10): 7934-41.

**Will, K. W., Liebherr, J. K., Maddison, D. R. and Galian, J.** (2005). "Absence asymmetry: the evolution of monorchid beetles (Insecta: Coleoptera: Carabidae)." J Morphol **264**(1): 75-93.

**Woods, D. C., Haugen, M. J. and Johnson, A. L.** (2005). "Opposing actions of TGFbeta and MAP kinase signaling in undifferentiated hen granulosa cells." Biochem Biophys Res Commun **336**(2): 450-7.

**Woods, D. C., Haugen, M. J. and Johnson, A. L.** (2007a). "Actions of epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase and protein kinase C signaling in granulosa cells from Gallus gallus are dependent upon stage of differentiation." Biol Reprod **77**(1): 61-70.

**Woods, D. C. and Johnson, A. L.** (2007b). "Protein kinase C activity mediates LH-induced ErbB/Erk signaling in differentiated hen granulosa cells." Reproduction **133**(4): 733-41.

**Woods, J. E.** (1987). "Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo." J Exp Zool Suppl **1**: 265-71.

**Woods, J. E. and Brazzill, D. M.** (1981). "Plasma 17 beta-estradiol levels in the chick embryo." Gen Comp Endocrinol **44**(1): 37-43.

**Woods, J. E., Congoran, D. D. and Thomes, R. C.** (1982). "Plasma estrone levels in the chick embryo." Poult Sci **61**(8): 1729-33.

**Woods, J. E., Damianides-Keenan, M. and Thommes, R. C.** (1991). "FSH- and TSH-binding cells in the ovary of the developing chick embryo." Gen Comp Endocrinol **82**(3): 487-94.

**Woods, J. E. and Weeks, R. L.** (1969). "Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo." Gen Comp Endocrinol **13**(2): 242-54.

**Wrathall, J. H. and Knight, P. G.** (1995). "Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro." J Endocrinol **145**(3): 491-500.

**Wylie, C. C.** (1972). "Nuclear morphology and nucleolar DNA synthesis during meiotic prophase in oocytes of the chick (*Gallus domesticus*)." Cell Differ **1**(5): 325-34.

**Xiao, S., Robertson, D. M. and Findlay, J. K.** (1992). "Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells." Endocrinology **131**(3): 1009-16.

**Yamada, D., Koyama, Y., Komatsubara, M., Urabe, M., Mori, M., Hashimoto, Y., Nii, R., Kobayashi, M., Nakamoto, A., Ogihara, J., Kato, J. and Mizuno, S.** (2004). "Comprehensive search for chicken W chromosome-linked genes expressed in early female embryos from the female-minus-male subtracted cDNA macroarray." Chromosome Res **12**(7): 741-54.

**Yamamoto, N., Christenson, L. K., McAllister, J. M. and Strauss, J. F., 3rd** (2002). "Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2849-56.

**Yamamoto, T.** (1962). "Hormonic factors affecting gonadal sex differentiation in fish." Gen Comp Endocrinol Suppl **1**: 341-5.

**Yamamoto, T.** (1969). Sex differentiation Fish physiology. New York, Hoar WS, Randall DJ., **3**: 117-175

**Yamamoto, Y., Usui, F., Nakamura, Y., Ito, Y., Tagami, T., Nirasawa, K., Matsubara, Y., Ono, T. and Kagami, H.** (2007). "A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken." Biol Reprod **77**(1): 115-9.

**Yang, X., Zheng, J., Xu, G., Qu, L., Chen, S., Li, J. and Yang, N.** (2009). "Exogenous cMHM regulates the expression of DMRT1 and ERalpha in avian testes." Mol Biol Rep.

**Yao, H. H., DiNapoli, L. and Capel, B.** (2003). "Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads." Development **130**(24): 5895-902.

**Ying, Y. and Zhao, G. Q.** (2001). "Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse." Dev Biol **232**(2): 484-92.

**Yoshida, K., Shimada, K. and Saito, N.** (1996). "Expression of P450(17 alpha) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation." Gen Comp Endocrinol **102**(2): 233-40.

**You, S., Bridgham, J. T., Foster, D. N. and Johnson, A. L.** (1996). "Characterization of the chicken follicle-stimulating hormone receptor (cFSH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cFSH-R messenger ribonucleic acid in the ovary." Biol Reprod **55**(5): 1055-62.

- You, S., Foster, L. K., Silsby, J. L., el Halawani, M. E. and Foster, D. N.** (1995). "Sequence analysis of the turkey LH beta subunit and its regulation by gonadotrophin-releasing hormone and prolactin in cultured pituitary cells." J Mol Endocrinol **14**(1): 117-29.
- Yu, F. Q., Han, C. S., Yang, W., Jin, X., Hu, Z. Y. and Liu, Y. X.** (2005). "Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially." J Endocrinol **186**(1): 85-96.
- Yu, R. N., Achermann, J. C., Ito, M. and Jameson, J. L.** (1998). "The Role of DAX-1 in Reproduction." Trends Endocrinol Metab **9**(5): 169-75.
- Zaccanti, F., Vallisneri, M. and Quaglia, A.** (1990). "Early aspects of sex differentiation in the gonads of chick embryos." Differentiation **43**(2): 71-80.
- Zachos, N. C., Billiar, R. B., Albrecht, E. D. and Pepe, G. J.** (2003). "Developmental regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger RNA expression in the baboon fetal ovary." Biol Reprod **68**(5): 1911-7.
- Zamboni, L. and Upadhyay, S.** (1983). "Germ cell differentiation in mouse adrenal glands." J Exp Zool **228**(2): 173-93.
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A. P., McCabe, E. R. and et al.** (1994). "An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita." Nature **372**(6507): 635-41.
- Zhang, Y., Li, F., Sun, D., Liu, J., Liu, N. and Yu, Q.** (2010). "Molecular analysis shows differential expression of R-spondin1 in zebrafish (*Danio rerio*) gonads." Mol Biol Rep.
- Zhang, Z. W., Findlay, J. K., Carson, R. S., Herington, A. C. and Burger, H. G.** (1988). "Transforming growth factor beta enhances basal and FSH-stimulated inhibin production by rat granulosa cells in vitro." Mol Cell Endocrinol **58**(2-3): 161-6.
- Zhao, D., McBride, D., Nandi, S., McQueen, H. A., McGrew, M. J., Hocking, P. M., Lewis, P. D., Sang, H. M. and Clinton, M.** (2010). "Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken." Nature **464**(7286): 237-42.
- Zhao, G. Q. and Garbers, D. L.** (2002). "Male germ cell specification and differentiation." Dev Cell **2**(5): 537-47.
- Zhao, J., Taverne, M. A., van der Weijden, G. C., Bevers, M. M. and van den Hurk, R.** (2001). "Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II." Biol Reprod **65**(3): 967-77.
- Zhu, X. and Rosenfeld, M. G.** (2004). "Transcriptional control of precursor proliferation in the early phases of pituitary development." Curr Opin Genet Dev **14**(5): 567-74.



**Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. M.** (1996). "The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4." Cell **86**(4): 599-606.

## **Annexes**

## Mise en évidence de l'expression et de l'activité de BMP1 dans le follicule ovarien de brebis

*Les figures mentionnées en gras font référence aux figures intégrées dans l'article.*

### Résumé de l'étude :

Dans le cadre de l'étude des rôles des BMPs dans l'ovaire, la poursuite d'un travail initié au cours de mon stage de MI a mené à une collaboration sur l'étude de l'expression et de l'activité de BMP1 dans les cellules de granulosa de brebis adulte cyclique.

BMP1 ne possédant pas d'activité de facteur de croissance, il n'est pas réellement un membre de la famille des BMPs mais ce gène code pour une métalloprotéase de la famille des astacines. Outre une activité de procollagénase, BMP1 présente une activité chordinase. Le clivage de chordin, un antagoniste des BMPs, libère dès lors BMP2 ou BMP4 dans le milieu extracellulaire engendrant une augmentation de leurs activités.

Cette étude a permis de montrer pour la première fois l'expression préférentielle de BMP1 dans les gonades, l'hypophyse et les poumons chez le mouton. De plus, l'expression de ce gène dans les gonades embryonnaires est détectée tout au long du développement mais sans dimorphisme sexuel apparent (**Figure 1 et 2**). De façon similaire, l'expression de ce gène (dont la protéine est détectée dans les cellules de granulosa) ne varie pas au cours de la folliculogénèse terminales (du stade de petit follicule à antrum jusqu'au follicule pré-ovulatoire ayant reçu la décharge de LH) (**Figure 4**).

D'autre part, la culture de cellules de granulosa en présence de BMP4 diminue l'expression de *BMP1* tandis que le traitement par l'activine A augmente l'expression de *BMP1* suggérant un rôle de BMP1 dans la régulation de l'activité des BMPs (SMAD1/5/8) versus l'activité du système des activines (SMAD2/3). De plus si la FSH et IGF1 seuls ne modifient pas l'expression de ce gène, lorsque les traitements sont combinés, il est observé une inhibition de l'expression de *BMP1* (**Figure 5**).

Puisque le lieu d'expression de la protéine BMP1 est préférentiel dans les cellules de granulosa (**Figure 3**), il a été supposé que l'activité de la protéine pouvait être retrouvée dans les liquides folliculaires composant l'antrum. Dans ces liquides folliculaires prélevés des petits et grands follicules, il est détecté une activité procollagénase qui est similaire à celle

observée en présence de la protéine recombinante humaine BMP1 et cette activité est plus importante dans les antrum des petits follicules (**Figure 6**). De manière similaire, il est observé une activité chordinase qui est également plus élevée dans les petits follicules à antrum (**Figure 7**).

## First Evidence of Bone Morphogenetic Protein 1 Expression and Activity in Sheep Ovarian Follicles<sup>1</sup>

Elizabeth Canty-Laird,<sup>3,5</sup> Gwenn-Aël Carré,<sup>3,4</sup> Béatrice Mandon-Pépin,<sup>6</sup> Karl E. Kadler,<sup>5</sup> and Stéphane Fabre<sup>2,4</sup>

Physiologie de la Reproduction et des Comportements,<sup>4</sup> UMR 85 INRA-UMR 6175 CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Nouzilly, France

Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research,<sup>5</sup> University of Manchester, Faculty of Life Sciences, Manchester, United Kingdom

Biologie du Développement et de la Reproduction,<sup>6</sup> UMR 1198 INRA-ENVA, 78350 Jouy en Josas, France

### ABSTRACT

Bone morphogenetic protein (BMP) 1 is a vertebrate metalloproteinase of the astacin family. BMP1 plays a key role in regulating the formation of the extracellular matrix (ECM), particularly by processing the C-propeptide of fibrillar procollagens. BMP1 also promotes BMP signaling by releasing BMP signaling molecules from complexes with the BMP-antagonist chordin. As a result of BMP1's dual role in both ECM formation and BMP signaling, we hypothesized that BMP1 could play a role in ovarian physiology. Using the sheep ovary as a model system, we showed that BMP1 was expressed in the ovary throughout early fetal stages to adulthood. Furthermore, in adult ovaries, BMP1 was expressed along with chordin, BMP4, and twisted gastrulation, which together form an extracellular regulatory complex for BMP signaling. Within ovine ovaries, immunohistochemical localization demonstrated that BMP1 was present in granulosa cells at all stages of follicular development, from primordial to large antral follicles, and that the levels of BMP1 were not affected by the final follicle selection mechanism. In cultured granulosa cells, *BMP1* expression was not affected by gonadotropins, but BMP4 and activin A had opposing effects on the levels of *BMP1* mRNA. BMP1 appeared to be secreted into the follicular fluid of antral follicles, where it is able to exert procollagen C-proteinase and chordinase activities. Interestingly, BMP1 activity in follicular fluid decreased with follicular growth.

*BMP1, follicle, follicular development, granulosa cells, ovary*

### INTRODUCTION

Bone morphogenetic protein (BMP) 1 is the vertebrate prototype of the tolloid family of metalloproteinases. The BMPs were initially identified as a complex of proteins capable of inducing ectopic bone formation [1]. Notably, the *BMP1* gene also codes for a second, longer protein named mammalian

tolloid (mTLD) [2]. Each of these proteins contains a protease domain, common to the astacin family of metalloproteinases, near the N-terminus [3]. This protease domain is followed by a regulatory region containing epidermal growth factor-like motifs, which are thought to bind calcium ions [4, 5], and "CUB" domains [6], which are thought to mediate protein-protein interactions [7]. Furthermore, a third alternatively spliced variant encodes a protein in which a novel histidine-rich region replaces the BMP1-specific C-terminal domain (denoted BMP1/His) [2]. BMP1 differs from the other BMPs in that it is a metalloproteinase rather than a transforming growth factor beta (TGFB)-like protein. Through cleavage of the BMP-antagonist chordin, BMP1 is thought to promote BMP signaling (and, thereby, bone formation) by releasing the TGFB-like morphogens BMP2 and BMP4 from extracellular latent complexes with chordin [8, 9]. BMP1 and mTLD also remove the C-propeptides from procollagens I–III [10, 11], an essential step in the formation of collagen fibrils and, hence, of all fibrous extracellular matrices (ECMs). The tolloid family of metalloproteinases further promotes ECM formation in numerous ways, including the processing of the minor collagens V and XI [12–14] and the proteolytic activation of lysyl oxidase [15], which is required for the formation of covalent cross-links in both collagen fibrils and in elastic fibers [16].

Regarding the biological actions described above (i.e., BMP ligand bioavailability and ECM remodeling), we hypothesized that BMP1 could play a role in ovarian physiology. BMP2 and BMP4 have been implicated in the autocrine/paracrine regulation of ovarian function in mammals and are thought to modulate folliculogenesis and ovulation rate [17–20]. For example, these BMP factors regulate granulosa cell differentiation and delay the luteinization process [21]. Coordinated release of BMP2 and BMP4 from chordin, by the chordinase activity of BMP1, could therefore regulate BMP signaling in the ovary. Through its procollagen C-proteinase (PCP) activity, BMP1 could also regulate the formation of ECM during ovarian folliculogenesis. The importance of the ECM for follicular development is exemplified by the observation that both the growth and atresia of ovine ovarian follicles is associated with dramatic changes in the composition of the collagenous ECM in which the theca and granulosa cells are embedded [22–24].

Using the ovine species as a model, the present study aimed to 1) identify BMP1 mRNA and protein in ovarian tissues, 2) study the regulation of *BMP1* transcripts by important modulators of folliculogenesis (i.e., gonadotropins, insulin-like growth factor 1 [IGF1], and TGFB family members), and 3) assay the PCP and chordinase activities of BMP1 in ovarian follicular fluids.

<sup>1</sup>Supported in part by the French "Région Centre" and by a Wellcome Trust Program Grant to K.E.K.

<sup>2</sup>Correspondence: Stéphane Fabre, INRA, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France. FAX: 33 247 42 7743; e-mail: stephane.fabre@tours.inra.fr

<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work.

Received: 23 October 2009.

First decision: 18 November 2009.

Accepted: 10 March 2010.

© 2010 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

## MATERIALS AND METHODS

### Hormones and Reagents

Fluogestone acetate sponges used to synchronize estrous cycles were obtained from Intervet. Porcine follicle-stimulating hormone (pFSH) from pituitary extracts (pFSH activity = 1.15-fold the activity of National Institutes of Health [NIH] pFSH-P1) (used for animal injections) and ovine luteinizing hormone (oLH activity = 1.38-fold the activity of NIH oLH-S21) were obtained from Dr. Y. Combarous (INRA, Nouzilly, France). Purified ovine FSH-20 (oFSH, lot no. AFP-7028D; 4453 IU/mg; FSH activity = 175-fold the activity of oFSH-S1), used in cell culture, was a gift from the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (National Hormone Pituitary Program, Bethesda, MD). Recombinant human BMP1, BMP4, and activin A were obtained from R&D Systems Europe. IGF1 was obtained from Ciba-Geigy. Recombinant TGF $\beta$ 1, rabbit polyclonal anti-BMP1, mouse monoclonal anti-Myc 9E10, and McCoy5A culture medium were obtained from Sigma-Aldrich.

### Animals

The estrous cycles of all adult ewes in the present study were synchronized with intravaginal sponges impregnated with fluogestone acetate (40 mg) for 14 days. This treatment mimics a luteal phase, with LH surge and ovulation occurring approximately 40 and 60 h, respectively, after sponge removal. All procedures were approved by the Agricultural and Scientific Research agencies (approval no. C37-175-2) and were conducted in accordance with the Guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

In a first set of *in vivo* experiments, Ile-de-France ewes were synchronized and killed at three time points after sponge removal: 36 h (group 1), 48 h (group 2), and 66 h (group 3). Before killing, blood samples were collected from the jugular vein at 2-h intervals: between 30 and 36 h for group 1, between 32 and 48 h for group 2, and between 34 and 66 h for group 3. Plasma was recovered from these samples and assayed to quantify serum levels of LH [25]. At slaughtering, ovaries were collected individually for immediate follicle dissection (to obtain granulosa cells and follicular fluid) or were frozen in cryoprotectant (Tissue-Tek, Sakura Finetek) for immunohistochemistry. At the same time, numerous tissues were collected, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After LH assays, samples were postclassified as "follicular" (follicular phase, before the LH surge) or "preovulatory" (after LH surge, before ovulation). Animals killed during the LH surge or after ovulation were not considered in the present study.

In a second set of *in vivo* experiments to assess fetal expression of *BMP1*, cyclic Préalpes ewes were synchronized and inseminated after sponge removal. Pregnant female tracts at different developmental stages were collected at slaughter and rapidly dissected to extract fetuses. Fetuses were collected at different stages from Day 25 to Day 127 of gestation. The gonads of newborn animals were collected at slaughtering. All gonads were first detached from the mesonephros (except from Day 25 to Day 34), immediately frozen in liquid nitrogen, and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

In a third set of *in vitro* cell culture experiments, Romanov ewes were synchronized for 14 days and further stimulated 10 days after sponge removal by intramuscular injections of 6 and 5 IU of pFSH administered 24 and 12 h, respectively, before slaughter. Ovaries were collected at slaughtering for immediate follicle dissection, recovery of granulosa cells, and *in vitro* cultures.

### Immunohistochemistry

Frozen ovaries from group 1 (36 h after sponge removal) were serially sectioned at a thickness of 20  $\mu\text{m}$  with a cryostat. Sections were fixed for 10 min in PBS containing 4% paraformaldehyde. After two 5-min washes with 0.1% saponin in PBS, sections were incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min with PBS containing 0.1% saponin and 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  to remove endogenous peroxidase activity. After three 5-min washes in 0.1% saponin in PBS, sections were incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight with rabbit polyclonal BMP1 antibody (B5058; Sigma) diluted 1:1000 in PBS containing 0.1% saponin and 0.1% bovine serum albumin. After three 5-min washes in PBS/0.1% saponin, sections were incubated for 4 h at room temperature with the donkey anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim) diluted 1:1000 in PBS containing 0.1% saponin and 0.1% bovine serum albumin. After three 5-min washes with 0.1% saponin in PBS, sections were incubated with PBS solution containing diaminobenzidine and  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 2 min at room temperature and then counterstained with hematoxylin. Negative controls were performed in which the primary antibody was replaced with rabbit IgG.

### Isolation of Granulosa Cells

For *in vivo* experiments, all visible follicles larger than 1 mm in diameter were rapidly dissected from the ovaries of Ile-de-France ewes. After dissection, follicle diameter was measured, and each follicle was classified according to size, animal, and status: small antral immature follicles (diameter, 1–3 mm) and large antral follicles (diameter,  $>6$  mm) were classified in the "follicular" group, and preovulatory follicles (diameter,  $>6$  mm) were classified into the "preovulatory" group. Subsequently, follicular fluid was recovered individually and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for downstream BMP1 protease activity assays. Granulosa cells were separated from the theca layer by gentle scraping, as previously described [26]. A small aliquot of the cells was smeared onto a glass slide and stained with Feulgen to assess the degree of follicle atresia [27]. Once the atresia status had been determined, granulosa cells from healthy small antral follicles from the same animal were pooled to obtain sufficient quantities of RNA after extraction. The granulosa cells from healthy large antral and preovulatory follicles were treated individually.

For each independent *in vitro* culture experiment, ovaries from four Romanov ewes were dissected to recover granulosa cells from small antral follicles (diameter, 1–3 mm) or large antral follicles (diameter,  $\geq 6$  mm), as previously described [28]. Granulosa cell suspensions were seeded at  $2 \times 10^6$  viable cells/well in six-well plates and cultured for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$  in McCoy5a medium supplemented with 3% fetal ovine serum. The cell culture medium was removed at 24 h, and the plated cells were washed twice with PBS. Cells were grown for 48 h in serum-free condition with or without the addition of exogenous factors (50 ng/ml of BMP4, 5 ng/ml of TGF $\beta$ 1, 50 ng/ml of activin A, 10 ng/ml of IGF1, 50 ng/ml of oFSH, or 50 ng/ml of oLH), either alone or in combination. Cells were then trypsinized, washed with PBS, pelleted by centrifugation ( $1300 \times g$ ), and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent RNA extraction. Each combination of treatments was tested in at least four independent culture experiments.

### RNA Extraction and Reverse Transcription

Total RNA from adult tissues or granulosa cell pellets was isolated using Nucleospin RNA L or Nucleospin RNA II kits, respectively, according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel) and diluted at 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in RNase-free water. RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was then reverse transcribed [29]. Total RNA from fetal gonads was extracted from each sample using RNA-plus solution (MP Biomedicals). RNA (5  $\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed as previously described [30]. All RNA samples were DNase-treated to avoid genomic DNA contamination. The quantitative yield of the purification and the quality of the RNA were determined using a NanoDrop ND1000 (Labtech) and by electrophoresis to ensure equal purity and the absence of RNA degradation in all samples.

### Polymerase Chain Reaction

Standard PCR was used initially to investigate gene expression in multiple tissues and in fetal gonads. Two microliters of each reverse transcription reaction were amplified in a 50- $\mu\text{l}$  PCR reaction using 0.5 U of Taq polymerase (Takara or Sigma-Aldrich) for 28–30 cycles, with 30–45 sec annealing at  $55$ – $58^{\circ}\text{C}$  (depending on the primers), with 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP and 150 nM of each primer. PCR reactions run without cDNA (water blank) on the one hand and with total RNA (non-reverse transcribed) to check for absence of genomic DNA contamination on the other served as negative controls. Primer sequences for each gene studied (Table 1) were designed in different exons (except for *BMP4* and *TWIST1*). *BMP1* primers were designed to amplify part of the region common to all RNA splice variants. The *RPL19* or *GAPDH* genes were used as cDNA quantity controls.

Real-time PCR was performed to compare differential gene expression in granulosa cells using the iCycler iQ Multicolor Detection System (Bio-Rad), as already described [29]. A melting curve was constructed for each primer pair to verify the presence of one gene-specific peak and the absence of primer dimers. This was further confirmed by agarose gel electrophoresis of the amplicon. For each primer pair, efficiency curves were generated using serial dilutions of granulosa cell cDNA in abscissa and the corresponding cycle threshold ( $C_t$ ) in ordinate. The slope of the log-linear phase reflects the amplification efficiency ( $E$ ) derived from the formula  $E = e^{(-1/\text{slope})}$ . Amplification efficiency was found to be  $E_{\text{BMP1}} = 1.86$  and  $E_{\text{RPL19}} = 1.95$ . To quantify relative gene expression, the  $C_t$  of *BMP1* amplification was compared with that of the internal reference gene *RPL19*, according to the ratio  $R = [E_{\text{RPL19}}^{C_t(\text{RPL19})} / E_{\text{BMP1}}^{C_t(\text{BMP1})}]$ . For each sample, real-time PCR was performed in duplicate.

TABLE 1. PCR primer sequences used in this study.

Gene	Primer sequences (5' → 3')		PCR type
<i>BMP1</i>	TACAAGTGCCAGCCTGTGG	GACACCTGGATCCGCCAGA	Classic
	GCTGTGCTGGTATGACTACG	CATCTGGGTAATGGGCGATTGG	Real-time
<i>CHRD</i>	ATTAAGTGTGCTGTCTGCAC	CCTGCCCCACATCTGCAGGT	Classic
<i>TWSG1</i>	GTGCTTCAAGTATCGGTGG	ATAATACCAGGCACAGTGG	Classic
<i>BMP4</i>	GCTCACCTTTGGCCATGATG	ACCTTGTCATACTCATCCAG	Classic
<i>GAPDH</i>	AGGCCATCACCATCTTCCAG	GGCGTGACAGTGGTCATAA	Classic
<i>RPL19</i>	AATGCCAATGCCAACTC	CCCTTTCGCTACCTATAAC	Classic/real-time

#### PCP Activity Assay

Neat follicular fluid samples (3  $\mu$ l) were assayed for PCP activity using human  $^{125}$ I-labeled type I procollagen substrate (0.6  $\mu$ g), as previously described [31, 32]. Digests were performed in procollagen assay buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% Brij 35, and 0.02% NaN<sub>3</sub>) containing ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA)-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science) in a final volume of 20  $\mu$ l. Negative controls contained 10 mM EDTA to inhibit metalloproteinase activity. Positive controls contained 500 ng of recombinant human BMP1 (R&D Systems) in place of follicular fluid. Digests were incubated at 37°C overnight and stopped by the addition of SDS loading buffer with reducing agent. Samples were analyzed by SDS PAGE (7% separating, 3.5% stacking), fixed twice for 20 min each time in methanol (10% v/v) with acetic acid (10% v/v), and then dried under vacuum. The gels were exposed to a BAS-MS phosphorimaging plate (Fujifilm), which was processed using an FLA3000 PhosphorImager (Fujifilm). Quantification was performed as previously described [33], with the percentage of labeled procollagen cleavage expressed as the mean  $\pm$  SD. The data were analyzed by one-way ANOVA.

#### Chordinase Activity Assay

Individual follicular fluid samples from small, large, and preovulatory follicles were pooled, and each sample group was assayed for chordinase activity. Follicular fluid pools (3  $\mu$ l) were incubated with 30  $\mu$ l of conditioned cell culture medium containing c-Myc-tagged chordin [34] in the presence of EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail. Negative controls contained 10 mM EDTA to inhibit metalloproteinase activity. Positive controls contained 500 ng of recombinant human BMP1 (R&D Systems) in place of follicular fluid.

Digests were made up to a final volume of 50  $\mu$ l with assay buffer (50 mM Tris HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% Brij 35, and 0.02% NaN<sub>3</sub>) and incubated at 37°C overnight. The reactions were stopped by the addition of SDS loading buffer with reducing agent and resolved by electrophoresis on a 10% SDS-Prosieve gel (Cambrex Bio Science Wokingham Ltd., Wokingham, UK). Chordin digestion products were detected by Western blotting with the mouse monoclonal 9E10 antibody (Roche Applied Science), anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Pierce/ThermoScientific), and Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce/ThermoScientific).

#### Data Analysis

All experimental data are presented as the mean  $\pm$  SEM, except where indicated. Data were analyzed using the Student *t*-test or by one-way ANOVA followed by either Tukey HSD or Newman-Keuls multiple-comparison test for comparisons between two or several means, respectively. For all analyses, differences with *P* > 0.05 were considered to be not significant.

## RESULTS

#### Spatiotemporal Expression of BMP1 in Sheep Ovaries

*BMP1* mRNA expression was assayed by RT-PCR in whole ovaries and ovarian follicles as well as in other ovine tissues (Fig. 1). *BMP1* appeared to be preferentially expressed in the ovary and ovarian follicles as well as in the pituitary, lung, and testis. The expression of chordin (*CHRD*), twisted gastrulation (*TWSG1*), and *BMP4* mRNA also was tested. Interestingly, *CHRD* exhibited a preferential expression in gonads, with an apparently higher level in testis than in ovary. *TWSG1* was expressed in the gonads of both sexes, with a preferential expression in lung compared to the other tissues tested. In contrast, *BMP4* was ubiquitously expressed.

Expression of *BMP1* was assayed at multiple stages of ovarian development by RT-PCR. RNA was extracted from gonads of sheep between 25 and 141 days postcoitum and at the time of birth. As shown in Figure 2, *BMP1* PCR products were present in the ovary at all stages of development, with no significant variation in mRNA levels. The same pattern of expression was observed throughout testis development.

Immunohistochemistry was used to localize BMP1 within the adult ovine ovary. Using an antibody to the prodomain of BMP1, BMP1 was produced predominantly by cells in the granulosa cell layer of all categories of follicle, from large antral to primordial follicle stages (Fig. 3). A faint staining also could be observed in oocytes and theca cells.

#### Regulation of BMP1 Expression in Granulosa Cells

Within the ovary, *BMP1* appeared to be expressed mainly by granulosa cells. To determine whether *BMP1* mRNA expression changes during the final maturation of antral follicles in vivo, real-time PCR analysis was performed on RNA from granulosa cells of small (diameter, 1–3 mm) and large (diameter, >6 mm) antral follicles recovered during the follicular phase of the estrous cycle and from preovulatory large follicles recovered after the endogenous LH surge. No

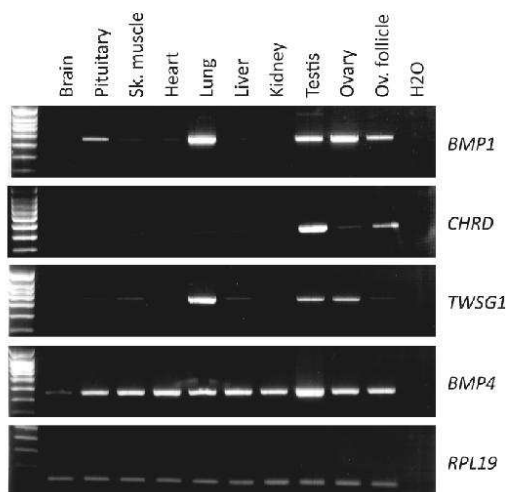


FIG. 1. Expression of *BMP1*, *CHRD*, *TWSG1*, and *BMP4* mRNAs in adult sheep tissues. Total mRNA was extracted from the tissues indicated and reverse transcribed before PCR analysis. Amplification of the *RPL19* gene amplification was used as a cDNA quality and quantity control.

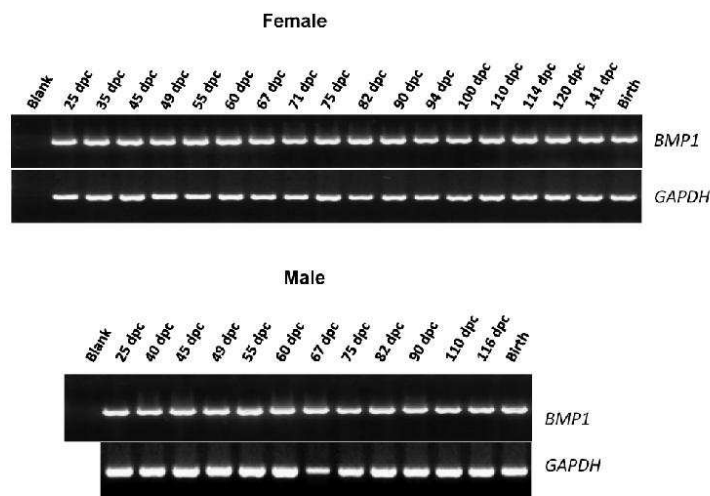


FIG. 2. *BMP1* mRNA expression in developing sheep gonads. Total RNA was extracted from sheep gonads obtained during embryogenesis (between 25 and 141 days postcoitum) or at birth and reverse transcribed before PCR analysis. The *GAPDH* gene was used as a cDNA quality control.

difference was found in the level of *BMP1* mRNA in granulosa cells from small, large, or preovulatory follicles (Fig. 4).

The effect of well-known regulators of folliculogenesis on *BMP1* mRNA expression in granulosa cells *in vitro* was then tested. Granulosa cells, isolated from either small or large follicles during the follicular phase, were cultivated in the presence or absence of gonadotropins (FSH and LH), IGF1, or TGF $\beta$  family members (BMP4, activin A, and TGF $\beta$ 1). *BMP1* mRNA levels were then determined using real-time PCR (Fig. 5). In granulosa cells from small follicles, both BMP4 and activin A were potent regulators of *BMP1* expression, in that *BMP1* mRNA levels were inhibited by BMP4 ( $P < 0.05$ ), whereas *BMP1* expression was stimulated by activin A ( $P < 0.01$ ) (Fig. 5A). Neither FSH nor IGF1 or TGF $\beta$ 1 alone were able to modulate *BMP1* expression. However, FSH and IGF1 in combination showed a tendency to inhibit the expression of *BMP1* mRNA ( $P = 0.09$ ). In granulosa cells from large follicles, neither FSH nor LH was found to regulate *BMP1* mRNA expression (Fig. 5B).

#### *BMP1* Biological Activity in Follicular Fluids

Because BMP1 protein was detected in granulosa cells by immunohistochemistry, we hypothesized that biologically active BMP1 could be present in the follicular fluid of antral follicles. Therefore, follicular fluids from small, large, and preovulatory ovarian follicles (collected from Ile-de-France ewes) were tested for specific proteolytic activity using PCP [11] and chordinase [8, 35] activity assays.

For the PCP assay, follicular fluids were incubated with  $^{14}$ C-labeled type I procollagen overnight, and the resulting digests were analyzed by SDS-PAGE. Procollagen was converted to pN collagen by recombinant BMP1 and also by the follicular fluid samples (Fig. 6A). The pro $\alpha$ 2 and pN $\alpha$ 1 chains are not well resolved, but the pro $\alpha$ 1 and pN $\alpha$ 2 (pro $\alpha$ 2 digestion product) chains are readily distinguished by their slower and faster migration speeds, respectively. The calculated percentage of cleavage was significantly higher in fluids from small follicles as compared to follicular fluid from large or preovulatory follicles (Fig. 6B). Of note, EDTA treatment does not result in complete loss of

the pN $\alpha$ 2 chain, because the  $^{14}$ C-labeled type I procollagen preparation used in the assay originally contained small amounts of contaminating pN collagen chains. To confirm the absence of any contaminating protease activity in the PCP assay, a series of procollagen assays were carried out in which  $^{14}$ C-labeled type I procollagen was incubated with and without BMP1 and/or EDTA, in triplicate. Student *t*-test showed no significant difference ( $P = 0.66$ ) between  $^{14}$ C-labeled type I procollagen incubated with both BMP1 and EDTA and incubated with neither BMP1 nor EDTA (data not shown). PCP activity in pooled follicular fluid samples was readily abolished by EDTA (Fig. 6C), confirming the presence of a specific and active metalloproteinase within follicular fluids.

Follicular fluids from small, large, and preovulatory follicles were incubated with c-Myc-tagged human chordin, and the cleavage products were detected by Western blotting (Fig. 7). Cleavage of chordin was evaluated by loss of the full-length c-Myc-tagged chordin and the appearance of a partially digested, 98-kDa fragment lacking the C-terminus as well as a smaller, 15-kDa partial fragment; both containing the N-terminal c-Myc tag (Fig. 7A). As expected, human recombinant BMP1 was able to cleave chordin to give these two fragments, and this cleavage was abolished by EDTA treatment. Follicular fluids also cleaved chordin (Fig. 7B), but interestingly, only the 15-kDa fragment was generated. The chordinase activity detected in follicular fluids was inhibited by EDTA treatment. Based on the intensity of the 15-kDa band, the chordinase activity appeared to be higher in follicular fluid from small follicles as compared to that from large antral and preovulatory follicles, as observed for PCP activity. Altogether, these results show a readily detectable, BMP1-like activity in follicular fluids from ovine follicles.

#### DISCUSSION

Numerous groups of proteinases are involved in diverse aspects of ovarian function in mammals; these include matrix metalloproteinases [36], plasminogen activator/plasmin [37], disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif proteins (ADAMTS) [38], cathepsin L [39], and pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1 (PAPPA)



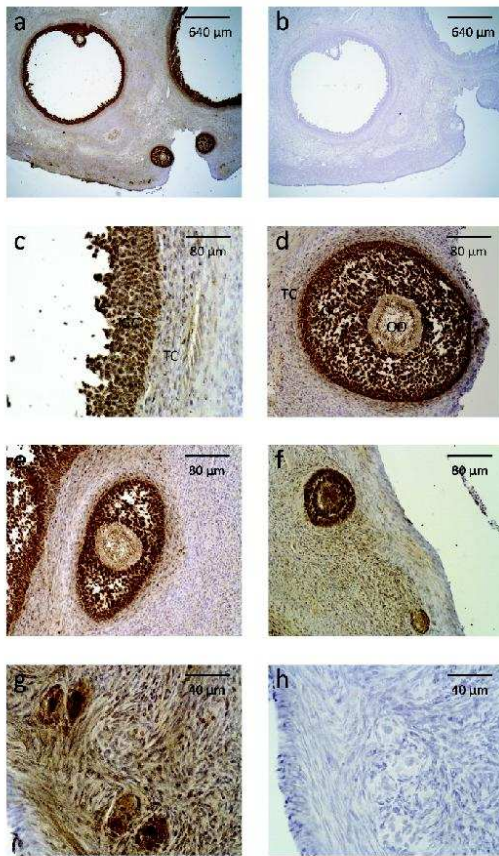


FIG. 3. Immunostaining for BMP1 in the sheep ovary. Photomicrographs of antral (a and c), preantral (d), secondary (e and f), primary (f), and primordial (g) follicles are shown. The photomicrographs shown in a and c-g correspond to immunostaining with anti-BMP1 rabbit polyclonal antibody. The photomicrographs shown in b and h correspond to immunostaining with control rabbit IgG. CC, granulosa cell; OO, oocyte; TC, theca cell.

[40]. These proteinases have been implicated in ECM remodeling and in the modulation of growth factor activity in the ovary [41, 42]. It has been hypothesized that BMP1 could function in ovarian development by cooperating with procollagen N-proteinases (namely, ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14) to promote the deposition and maturation of collagen fibrils [42]. However, until now, BMP1 had not been identified or localized within ovarian tissues.

The present data show that *BMP1* is expressed in ovine ovarian tissues throughout ovarian development, from fetal stages to adulthood. The *BMP1* mRNA expression levels were not significantly different when comparing small (diameter, 1–3 mm) and large (diameter,  $\geq 6$  mm) antral follicles before and after the LH surge, and this correlated with the immunostaining pattern obtained using the BMP1 antibody. These results are also consistent with the observation that neither FSH, LH, nor

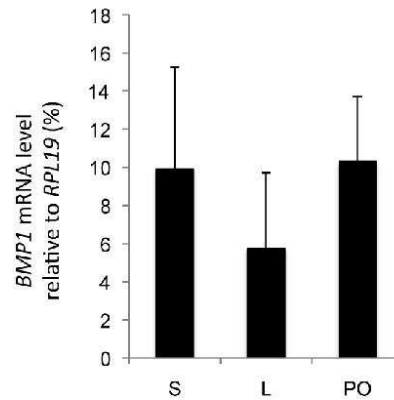


FIG. 4. In vivo regulation of *BMP1* mRNA expression during terminal follicular maturation. Total RNA extracted from granulosa cells isolated from small (S; n = 5), large (L; n = 3), and preovulatory (PO; n = 4) ovine follicles was reverse transcribed and analyzed by real-time PCR. Data (mean  $\pm$  SEM) represent the percentage of expression of *BMP1* mRNA relative to the *RPL19* reference gene.

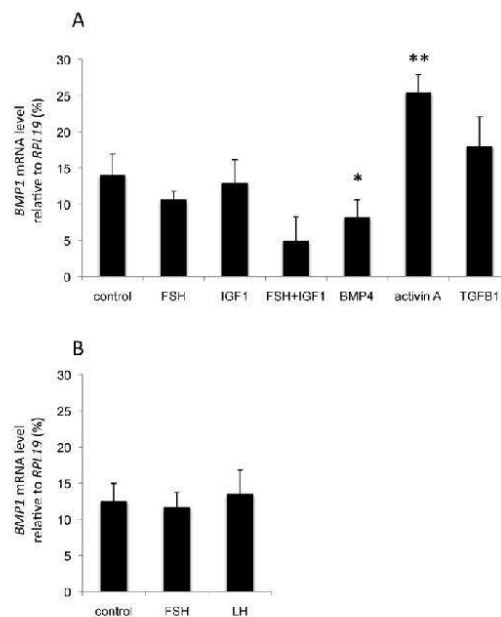


FIG. 5. In vitro regulation of *BMP1* mRNA expression by the main regulators of folliculogenesis. Granulosa cells from small (A) or large (B) ovine follicles were cultured for 24 h in the presence of fetal ovine serum and then grown for 48 h in serum-free medium in the absence (control) or presence of FSH (50 ng/ml), LH (50 ng/ml), IGF1 (10 ng/ml), BMP4 (50 ng/ml), activin A (50 ng/ml), or TGFβ1 (5 ng/ml). At the end of the culture period, mRNA was extracted and reverse transcribed before quantitative real-time PCR analysis. Data are presented as the percentage of *BMP1* mRNA levels (mean  $\pm$  SEM, n = 5) relative to the *RPL19* reference gene. \* $P < 0.05$  or \*\* $P < 0.01$  for each treatment vs. control.

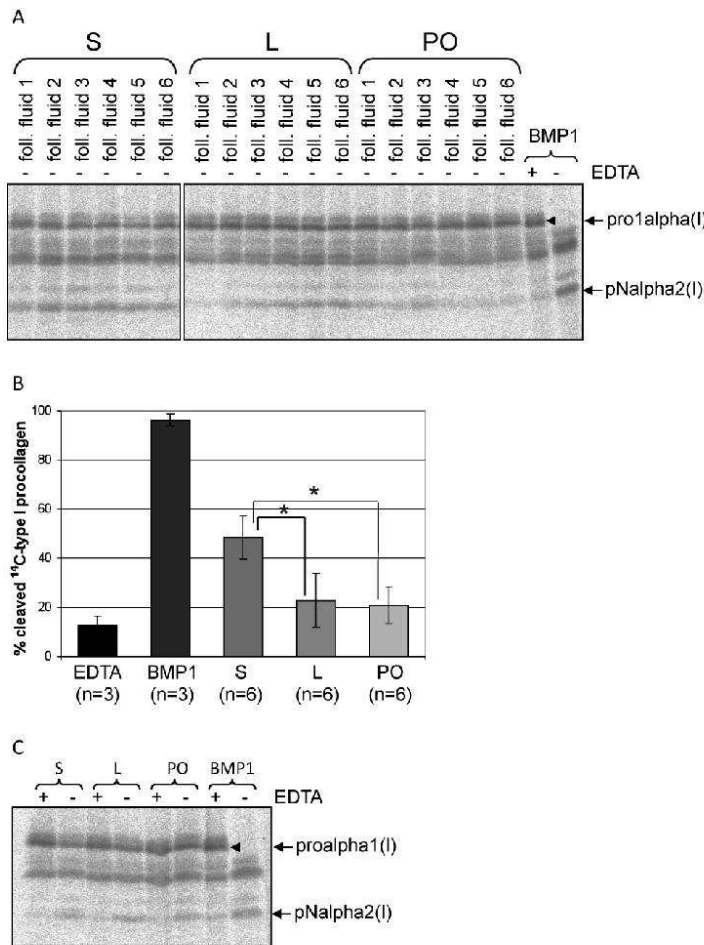


FIG. 6. Evidence of procollagen C-proteinase activity in sheep ovarian follicular fluids. Neat follicular fluid samples were incubated with <sup>14</sup>C-labeled type I procollagen overnight at 37°C, as described in *Materials and Methods*. The digests were separated by SDS-PAGE, and the radiolabeled collagen chains were detected using a PhosphorImager. Recombinant BMP1 was used as a positive control in which almost all of the procollagen was converted to pN collagen, a normal intermediate in the conversion of procollagen to collagen in which the N-propeptides, but not the C-propeptides, are retained. A) SDS-PAGE gel (7%) of [<sup>14</sup>C]procollagen digests. Procollagen C-proteinase (PCP) activity is readily detected by the appearance of the pN-alpha2 collagen chain. Follicular fluids from small (S), large (L), and preovulatory (PO) follicles were assayed for PCP activity. B) Graph representing the results of densitometric quantification of the extent of procollagen cleavage (mean ± SD) following overnight incubation with recombinant BMP1 (BMP1), recombinant BMP1 with EDTA (EDTA), or follicular fluids from S, L, or PO follicles. \*P < 0.01 by one-way ANOVA and Tukey HSD. C) PCP activity in follicular fluid samples is inhibited by EDTA. Pools of follicular fluid samples from small or large follicles were incubated with <sup>14</sup>C-labeled type I procollagen in the presence or absence of EDTA. Addition of EDTA inhibited the metalloproteinase-dependent conversion of procollagen to pN collagen.

Downloaded from www.biolreprod.org.

IGF1 regulated *BMP1* expression in vitro despite being known to potentiate the maturation of granulosa cells.

Little is known about the regulation of the *BMP1* gene expression, but *BMP1* is up-regulated by TGFβ1 in fibrogenic cells and keratinocytes [43, 44]. In our granulosa cell cultures, TGFβ1 showed only a slight tendency to increase *BMP1* expression, but activin A had a highly significant effect. This may indicate a crucial role for the SMAD2/3 pathway in regulating BMP1 expression, which is induced preferentially by activin A in granulosa cells rather than by TGFβ1, as in fibroblasts or keratinocytes. In the present study, BMP4 inhibited *BMP1* RNA accumulation in granulosa cells. Because BMP1 can regulate the bioavailability of BMP4 by cleaving chordin [9] and of TGFβ1 by cleaving latent TGFβ-binding protein [45], BMP1 is now found at the center of a putative feedback loop that orchestrates TGFβ superfamily ligand signaling in the ovary. BMP1 could therefore result in coordinated signaling through both the SMAD2/3 and

SMAD1/5/8 signaling pathways, which are used by TGFβ/activin and BMP4, respectively [46].

The antibody used to immunolocalize BMP1 was raised against a sequence from the prodomain of BMP1 and, hence, recognizes latent, but not active, BMP1. The immunostaining pattern therefore likely represents the intracellular, newly synthesized zymogen, because BMP1 is activated just before secretion [47], and this conclusion is supported by the predominantly cellular staining pattern obtained in the tissue sections. Interestingly, the BMP1 prodomain itself directly binds BMP2 and BMP4 and modulates processes regulated by BMP signaling [48]. The lower levels of immunoreactivity observed between cells in ovarian tissues could represent the extracellular free prodomain of BMP1 alone or the prodomain complexed to BMP2 or BMP4. Therefore, the identification of both the proform as well as enzymatically active BMP1 in the present study has both direct (via prodomain binding) and indirect (via chordinase cleavage) implications for the regulation and modulation of BMP signaling in the ovary.

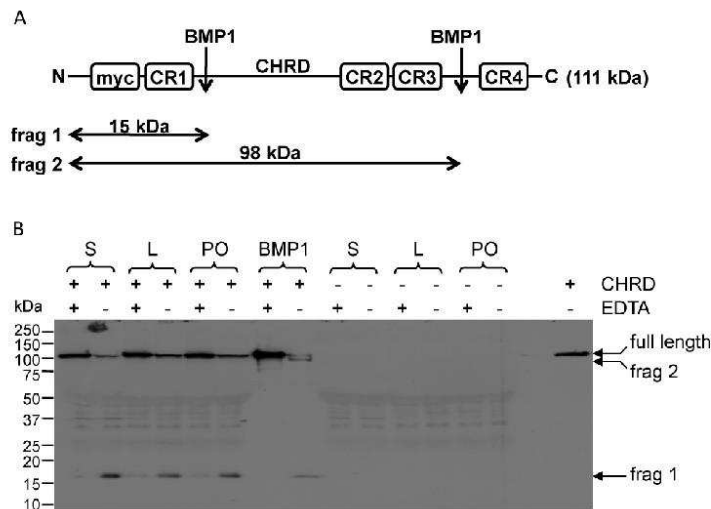


FIG. 7. Evidence of chordinase activity in sheep ovarian follicular fluids. **A**) Schematic depicting the domain structure of N-terminal c-Myc-tagged chordin. **B**) c-Myc-tagged chordin from the cell culture medium of transfected 293EBNA cells was incubated with follicular fluid samples or with recombinant BMP1, in the presence or absence of EDTA, overnight at 37°C. Control incubations were also performed using unconditioned cell culture medium in place of Myc-tagged chordin to identify bands resulting from the nonspecific binding of 9E10 to untagged proteins on the Western blot. Samples were separated by electrophoresis, and the chordin cleavage products were detected by Western blotting using the anti-Myc monoclonal antibody 9E10. Chordinase activity was inhibited in samples treated with EDTA. In follicular fluid samples, chordinase activity could be detected a reduction in the amount of full-length chordin and by the appearance of an approximately 17-kDa chordin cleavage product, corresponding to fragment 1. Both fragment 1 and fragment 2 were produced by recombinant BMP1 (see *Discussion*). Chordinase activity appears to be slightly higher in follicular fluid samples from small follicles.

In mature ovaries, granulosa cells were the main sites of BMP1 synthesis, as determined by immunohistochemistry, implying that BMP1 is activated and secreted directly into the antrum from the granulosa cell layer. BMP1 could not be detected in follicular fluids by immunohistochemistry, because only the tissue portions of the follicle and the ovary were retained during tissue processing. However, PCP and chordinase enzymatic activities were present in follicular fluid. Only BMP1 (but not mTLD) and the related tolloid-like metalloproteinase, tolloid-like 1 (TLL1), have been shown to possess chordinase activity [8, 9] as well as PCP activity. Hence, although we have demonstrated *BMP1* mRNA and protein expression, the enzymatic activities detected within follicular fluids could be attributed, either in part or entirely, to TLL1.

The BMP1-like enzymatic activity present in follicular fluid appeared to decrease during the final phase of follicular growth, during the maturation from small to large antral follicles. This decrease in activity could be the result of a decrease in protein concentration, although no such differences were detected by Western blotting (data not shown), which confirms the result obtained at the RNA level *in vivo* and *in vitro*. As an alternative explanation, BMP1 could become denatured over time and lose its activity. The stability of BMP1 could be regulated by posttranslational glycosylation, which could affect its susceptibility to subsequent denaturation [49]. BMP1 activity is regulated by both enhancers and inhibitors of enzyme activity. For example, PCP enhancers can promote the PCP activity of BMP1 and TLL1, but they do not enhance chordinase activity [35, 50]. Hence, it is unlikely that PCP enhancers regulate BMP1 activity in follicular fluids, because an increased chordinase activity, as well as increased PCP

activity, was observed in fluid from small follicles. However, it has recently been shown that both the PCP and chordinase activities of BMP1 can be enhanced by fibronectin [51]. Furthermore, fibronectin is present in follicular fluids [23]; therefore, increased levels or bioavailability of fibronectin in small follicles could act to enhance BMP1 activity. BMP1 can be irreversibly inhibited by alpha-2-macroglobulin (A2M) [52], a plasma protein that is present in follicular fluids. A2M has been shown to inhibit matrix metalloproteinases involved in ECM remodeling around the time of ovulation [53] so that increased A2M levels in large follicles could act to reduce BMP1 activity. Secreted frizzled-related protein (Sfrp/sizzled), an inhibitor of the Wnt signaling pathway, has been reported to act as a BMP1 inhibitor in *Xenopus* sp. and zebrafish [54, 55], whereas SFRP2 is a PCP enhancer in mice [56]. Little is known about SFRP levels during ovarian follicular maturation, but they could act to regulate intrafollicular BMP1 activities.

Cleavage of chordin by follicular fluids produced fragment 1 (the 15-kDa N-terminal Myc-tagged fragment) in preference to fragment 2 (the 98-kDa N-terminal Myc-tagged fragment), whereas incubation with recombinant BMP1 produced both fragments, in accordance with published data [8, 34, 35, 50, 57]. The concentration of recombinant BMP1 used was sufficient to convert an approximately equimolar amount of procollagen to pNcollagen, and it is unlikely that the amount of BMP1 present in the chordinase assay was insufficient to completely cleave chordin. Therefore, this could indicate that proteolysis at one chordin cleavage site could inhibit the second cut, either by an unfavorable conformational change in the substrate or because of negative feedback inhibition by the shorter cleavage product. Enhancer molecules present in

follicular fluid, such as fibronectin [51], could favor the cleavage reaction proceeding to completion. Alternatively, twisted gastrulation (TWSG1), which has been shown to facilitate cleavage of chordin at a distinct site between CR1 and CR2 [57], could indirectly result in further chordin cleavage to produce the 15-kDa fragment. In support of this notion, *TWSG1* was expressed in ovarian follicles (Fig. 1) along with *BMP1* and *CHRD*. Additionally, it is conceivable that cleavage between CR3 and CR4 is directly inhibited by an unidentified protein present in follicular fluid, resulting in preferential cleavage at the site located just C-terminal to the CR1 domain, or that the protein composition of follicular fluids prevents the enzymatic denaturation of BMP1 during the assay.

During terminal development of ovarian follicles in sheep, as in other mammals, granulosa cells lose their proliferative activity, differentiate into estradiol-secreting cells, and finally, luteinize into progesterone-secreting cells in response to the LH preovulatory surge [58]. These transitions in granulosa cell activity are under the control of endocrine and paracrine factors, such as pituitary gonadotropins and ovarian growth factors, but also are regulated by ECM components [59]. Ovine granulosa cells are surrounded by fibronectin, laminin, collagen types I and IV, and heparan sulfate proteoglycans [23]. Type I collagen levels in particular are increased in the granulosa cell layer during terminal follicular growth, and these collagens are particularly important in follicles around 3 mm in diameter [23]. Therefore, as well as regulating the BMP signaling pathway and contributing to the assembly and maturation of collagenous ECM in the theca cell layers and collagenous stroma, BMP1 could participate in type I collagen fibril deposition in the granulosa cell layer—as attested by the PCP activity detected in the follicular fluid of small ovarian follicles. Furthermore, the decline in PCP activity in large follicles at the end of follicular growth and after the LH surge could make way for collagenases, such as matrix metalloproteinases, or for other proteases implicated in follicle rupture during ovulation [42].

In conclusion, the present data show the expression of BMP1 in the ovary at both the mRNA and protein levels, as well as a BMP1-like protease activity in follicular fluids. Taken together, these observations suggest a new physiological role for BMP1 metalloproteinases in the ovary. Further investigations are needed to determine whether BMP1 exerts this function mainly through modulating the action of BMP/TGF $\beta$  molecules, by contributing to the deposition of ECM, or by a concerted action through both pathways.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the "ruminant" team of the Experimental Unit UEPAO for animal management and Catherine Taragnat for participation in the experimental design. The authors also thank Joël Fontaine for LH assays in ovine plasma.

#### REFERENCES

- Wozney J, Rosen V, Celeste A, Mitsock L, Whitters M, Kriz R, Hewick R, Wang E. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242:1528–1534.
- Takahara K, Lyons GE, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1 and a mammalian tollid homologue (mTld) are encoded by alternatively spliced transcripts which are differentially expressed in some tissues. *J Biol Chem* 1994; 269:32572–32578.
- Dumermuth E, Sterchi E, Jiang W, Wolz R, Bond J, Flannery A, Beynon R. The astacin family of metalloendopeptidases. *J Biol Chem* 1991; 266: 21381–21385.
- Davis CG. The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol* 1990; 2:410–419.
- Handford PA, Mayhew M, Baron M, Winship PR, Campbell ID, Brownlee GG. Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains. *Nature* 1991; 351:164–167.
- Bork P, Beckmann G. The CUB domain: a widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 1993; 231:539–545.
- Tosi M, Duponchel C, Meo T, Julier C. Complete cDNA sequence of human complement C1s and close physical linkage of the homologous genes C1s and C1r. *Biochemistry* 1987; 26:8516–8524.
- Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, Imamura Y, Clark TG, Steigltz BM, Thomas CL, Maas SA, Takahara K, Cho KW, Greenspan DS. Mammalian BMP-1/tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian tollid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev Biol* 1999; 213:283–300.
- Pappano WN, Steigltz BM, Scott IC, Keene DR, Greenspan DS. Use of *Bmp1/Tld1* doubly homozygous null mice and proteomics to identify and validate *in vivo* substrates of bone morphogenetic protein 1/tolloid-like metalloproteinases. *Mol Cell Biol* 2003; 23:4428–4438.
- Li SW, Sieron AL, Fertala A, Hojima Y, Arnold WV, Prockop DJ. The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenetic protein-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:5127–5130.
- Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 1996; 271:360–362.
- Imamura Y, Steigltz BM, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1 processes the NH<sub>2</sub>-terminal propeptide, and a furin-like proprotein convertase processes the COOH-terminal propeptide of pro- $\alpha$ 1(V) collagen. *J Biol Chem* 1998; 273:27511–27517.
- Unsold C, Pappano WN, Imamura Y, Steigltz BM, Greenspan DS. Biosynthetic processing of the pro- $\alpha$ 1(V)<sub>2</sub>pro- $\alpha$ 2(V) collagen heterotrimer by bone morphogenetic protein-1 and furin-like proprotein convertases. *J Biol Chem* 2002; 277:5596–5602.
- Medeck RJ, Sosa S, Morris N, Oxford JT. BMP-1-mediated proteolytic processing of alternatively spliced isoforms of collagen type XI. *Biochem J* 2003; 376:361–368.
- Uzel MI, Scott IC, Babakanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, Greenspan DS, Trackman PC. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem* 2001; 276: 22557–22543.
- Kagan HM, Trackman PC. Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:206–210.
- Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen J-M, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 139–154.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004; 25:72–101.
- Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, Monget P, Monniaux D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4:e20.
- Knight PG, Glistler C. TGF- $\beta$  (beta) superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132:191–206.
- Knight PG, Glistler C. Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 2003; 78:165–183.
- Huet C, Monget P, Pisselet C, Hennequet C, Locatelli A, Monniaux D. Chronology of events accompanying follicular atresia in hypophysectomized ewes. Changes in levels of steroidogenic enzymes, connexin 43, insulin-like growth factor II/mammosome 6 phosphate receptor, extracellular matrix components, and matrix metalloproteinases. *Biol Reprod* 1998; 58: 175–185.
- Huet C, Monget P, Pisselet C, Monniaux D. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod* 1997; 56:1025–1034.
- Berkholtz CB, Lai BE, Woodruff TK, Shea LD. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. *Histochem Cell Biol* 2006; 126: 583–592.
- Faure M-O, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, Taragnat C. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol* 2005; 186:109–121.
- Monniaux D, Pisselet C. Control of proliferation and differentiation of

- ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod* 1992; 46:109-119.
27. Monniaux D. Short-term effects of FSH in vitro on granulosa cells of individual sheep follicles. *J Reprod Fertil* 1987; 79:505-515.
  28. Le Bellego F, Pisselet C, Huet C, Monget P, Monniaux D. Laminin- $\alpha$ 6 $\beta$ 1 integrin interaction enhances survival and proliferation and modulates steroidogenesis of ovine granulosa cells. *J Endocrinol* 2002; 172:45-59.
  29. Monniaux D, Clemente Nd, Touze J-L, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard J-Y, Fabre S. Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod* 2008; 79:387-396.
  30. Mandon-Pepin B, Oustry-Vaiman A, Vigier B, Piumi F, Cribiu E, Cofinot C. Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. *Biol Reprod* 2003; 68:985-995.
  31. Hojima Y, van der Rest M, Prockop DJ. Type I procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1985; 260:15996-16003.
  32. Garrigue-Antar L, Barker C, Kadler KE. Identification of amino acid residues in bone morphogenetic protein-1 important for procollagen C-proteinase activity. *J Biol Chem* 2001; 276:26237-26242.
  33. Hartigan N, Garrigue-Antar L, Kadler KE. Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1). Identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase activity. *J Biol Chem* 2003; 278:18045-18049.
  34. Garrigue-Antar L, Francois V, Kadler KE. Deletion of epidermal growth factor-like domains converts mammalian tolloid into a chordinase and effective procollagen C-proteinase. *J Biol Chem* 2004; 279:49835-49841.
  35. Petropoulou V, Garrigue-Antar L, Kadler KE. Identification of the minimal domain structure of bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) for chordinase activity: chordinase activity is not enhanced by procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1). *J Biol Chem* 2005; 280:22616-22623.
  36. Curry TE Jr, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 2003; 24:428-465.
  37. Ny A, Leonardsson G, Hagglund A-C, Hagglof P, Ploplis VA, Carmeliet P, Ny T. Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology* 1999; 140:5030-5035.
  38. Shozu M, Minami N, Yokoyama H, Inoue M, Kurihara H, Matsushima K, Kuno K. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J Mol Endocrinol* 2005; 35:343-355.
  39. Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4689-4694.
  40. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17:10-18.
  41. Curry TE, Smith MF. Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition. *Semin Reprod Med* 2006; 24:228-241.
  42. Ohnishi J, Ohnishi E, Shibuya H, Takahashi T. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1751:95-109.
  43. Lee S, Solow-Cordero DE, Kessler E, Takahara K, Greenspan DS. Transforming growth factor-beta regulation of bone morphogenetic protein-1/procollagen C-proteinase and related proteins in fibrogenic cells and keratinocytes. *J Biol Chem* 1997; 272:19059-19066.
  44. Bock O, Hofmann J, Theophile K, Hussein K, Wiese B, Schlue J, Kreipe H. Bone morphogenetic proteins are overexpressed in the bone marrow of primary myelofibrosis and are apparently induced by fibrogenic cytokines. *Am J Pathol* 2008; 172:951-960.
  45. Ge G, Greenspan DS. BMP1 controls TGF $\beta$ 1 activation via cleavage of latent TGF $\beta$ -binding protein. *J Cell Biol* 2006; 175:111-120.
  46. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19:2783-2810.
  47. Leighton M, Kadler KE. Paired basic/furin-like proprotein convertase cleavage of pro-BMP-1 in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 2003; 278:18478-18484.
  48. Jasuja R, Ge G, Voss NG, Lyman-Gingerich J, Branam AM, Pelegri FJ, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4. *J Biol Chem* 2007; 282:9053-9062.
  49. Garrigue-Antar L, Hartigan N, Kadler KE. Post-translational modification of bone morphogenetic protein-1 is required for secretion and stability of the protein. *J Biol Chem* 2002; 277:43327-43334.
  50. Moali C, Font B, Ruggiero F, Eichenberger D, Rousselle P, Francois V, Oldberg A, Bruckner-Tuderman L, Hulmes DJ. Substrate-specific modulation of a multisubstrate proteinase: C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only BMP1-dependent activity to be enhanced by PCPE-1. *J Biol Chem* 2005; 280:24188-24194.
  51. Huang C, Zhang Y, Kim B, Ge G, Amis DS, Mosher DF, Greenspan DS. Fibronectin binds and enhances the activity of bone morphogenetic protein 1. *J Biol Chem* 2009; 284:25879-25888.
  52. Zhang Y, Ge G, Greenspan DS. Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of  $\alpha$ 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 2006; 281:39096-39104.
  53. Curry TE Jr, Mann JS, Estes RS, Jones PB.  $\alpha$ 2-Macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases: collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries. *Endocrinology* 1990; 127:63-68.
  54. Lee HX, Ambrosio AL, Reversade B, De Robertis EM. Embryonic dorso-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. *Cell* 2006; 124:147-159.
  55. Muraoka O, Shimizu T, Yabe T, Nojima H, Bae Y-K, Hashimoto H, Hibi M. Sizzled controls dorso-ventral polarity by repressing cleavage of the chordin protein. *Nat Cell Biol* 2006; 8:329-338.
  56. Kobayashi K, Luo M, Zhang Y, Wilkes DC, Ge G, Grieskamp T, Yamada C, Liu T-C, Huang G, Basson CT, Kispert A, Greenspan DS, et al. Secreted frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol* 2009; 11:46-55.
  57. Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, Maas SA, Cho KKY, Greenspan DS. Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signaling. *Nature* 2001; 410:475-478.
  58. Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 51:3-23.
  59. Huet C, Pisselet C, Mandon-Pepin B, Monget P, Monniaux D. Extracellular matrix regulates ovine granulosa cell survival, proliferation and steroidogenesis: relationships between cell shape and function. *J Endocrinol* 2001; 169:347-360.

## Discussion et perspectives :

Cette étude représente la première mise en évidence de l'expression et de l'activité de BMP1 dans les ovaires de mammifères. Aucune variation dans l'expression du gène n'est détectée au cours de la maturation folliculaire, de même les gonadotropines qui sont fondamentales aux transitions folliculaires ne modifie pas l'expression de ce gène. Néanmoins, il est observé une diminution des activités procollagénase et chordinase au cours de cette maturation terminale des follicules. Cette diminution de l'activité ayant lieu sans modification des niveaux de synthèse protéique, il existerait dès lors des régulations post-traductionnelles régulant ces activités. Ainsi l'activité de procollagénase plus importante dans les petits follicules pourrait participer au dépôt des collagènes de type I qui sont particulièrement important dans l'édification des petits follicules à antrum de 3mm de diamètre (Monniaux *et al.*, 1997). D'autre part, la diminution de ces activités dans les plus grands follicules, pourraient permettre de laisser entrer en jeu les autres protéases qui sont particulièrement importante pour lors de la rupture folliculaire au moment de l'ovulation (Ohnishi *et al.*, 2005).

Malgré l'absence de variation dans les niveaux d'expression du gène *BMP1* et malgré l'absence de dimorphisme sexuel au cours du développement embryonnaire chez le mouton ; il pourrait y avoir comme chez l'adulte une variation des activités. L'activité procollagénase pourrait participer aux remaniements des matrices extracellulaires et ainsi participer à l'édification des différents compartiments de l'ovaire et d'autre part, l'activité chordinase pourrait participer à la régulation de la signalisation des membres de la famille des TGF $\beta$ . Cependant, dans notre « modèle poulet », nous n'avons réussi à amplifier le transcrit de BMP1 laissant penser que celui-ci est absent au cours du développement gonadique.

## Valorisation du travail de recherche

### Publication:

**Carre, G. A., Canty-Laird, E., Mandon-Pepin, B., Kadler, K. E. and Fabre, S.** (2010). "First evidence of bone morphogenetic protein 1 expression and activity in sheep ovarian follicles." Biol Reprod **83**(1): 138-46.

### Communications orales:

Les noms soulignés se rapportent aux personnes ayant présenté le travail.

**Carre G., F. S., Couty I., Brillard J.P., Govoroun M.** (2009). BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein): new actor during the gonadal development in the chicken embryo? Fifth International Symposium on Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii (USA),

**Carré, G. A., Fabre, S., Couty, I., Brillard, J.P., Govoroun, M.S.** (2009). BMP4: Etude fonctionnelle au cours du développement gonadique chez l'embryon de poulet 3ème journée d'animation du département PHASE. TOURS,

**Cotinot, C., Pailhoux, E., Pannetier, M., Mandon-Pepin, B., Carre, G.A., Fabre, S., Govoroun, M., Boehne, A., Brunet, F., Galiana-Arnoux, D., Schultheis, C., Semon, M., Volf, J.N., Desvignes, T., Guiguen, Y., Mourot, B., Yano, A., Fostier, A.** (2008). Implication des membres de la super famille des TGF bêta dans la différenciation gonadique chez les vertébrés Journées de Restitution des Projets financés sur Crédits Incitatifs en 2006 et 2007 - Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage. Tours (FRA): 43

**Govoroun, M., Carré, G.A., Couty I., Brillard, J.P.** (2008). Gene expression profiling during gonadal differentiation in chicken 20. International Congress of Zoology ; 2008/08/26-29. B. P. a. I. C. (GBR). Paris (FRA): p.33

### Posters:

**Canty-Laird, E. G., Carré, G., Fabre, Stéphane S.** (2009). Identification of BMP1/Tolloid metalloproteinases in the developing ovarian follicle British Society for Matrix Biology Meeting. D. R. Katz. Cardiff (GBR): p:A98

## Listes des amorces utilisées en PCR en temps-réel (Tableau 2)

Nom du gène	Symbole du gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Numéro d'accèsion	Chromosome
activin A receptor, type I	<i>ACVR1</i>	CCCATGTGGCTTCTTACAGAGG	TTGACCGTTTGTGAAATGCC	<a href="#">NM_204560</a>	7
activin A receptor, type IIA	<i>ACVR2A</i>	TATAACGGTTCCGCAAGAAGG	GTTTCTGATCTGCCAAGAATGG	<a href="#">NM_205367</a>	7
activin A receptor, type IIB	<i>ACVR2B</i>	AAAACGCAAAACCACACCGA	GCTCCCAGTTGGCGTTGTAGTA	<a href="#">NM_204317</a>	2
ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 12	<i>ADAMTS12</i>	ATGAATCGTCCGTGTGAAACC	TGAATGCCAACGGAAGACC	<a href="#">XR_027030</a>	Z
ADAMTS-like 1	<i>ADAMTSL1</i>	CCTGAAGCGGAAGTTACTTGG	TTACCTCCCCACGTAGATTGG	<a href="#">XM_413844</a>	10
androgen receptor	<i>AR</i>	ACAAGATGAAGCTGAGGCAGC	TGCTTAGCAGGTTGGAGAAGG	<a href="#">NM_001040090</a>	4
anti-Müllerian hormone	<i>AMH</i>	TCCACAGCTTTCGCGAGAA	CACATTTCCCTCTTTGCTCCA	<a href="#">NM_205030</a>	28
aquaporin 1 (Colton blood group)	<i>AQP1</i>	CTCAATGCGCTTGCAAAAGG	AACGCACAAAACCAGCTGG	<a href="#">NM_001039453</a>	2
BARX homeobox 1	<i>BARX1</i>	AAGCAGAAGTACTCTCGACGC	CCATTTTCATGCGCCTGTTC	<a href="#">NM_204193</a>	12
bone morphogenetic protein 2	<i>BMP2</i>	AAGGCATCCGTTGTATGTGG	AGCGGAAAAGGACATTCCC	<a href="#">NM_204358</a>	3
bone morphogenetic protein 3	<i>BMP3</i>	AAAATGGATTCAACCAGCCG	CCTTGCAAACCTGGAACAACG	<a href="#">NM_001034819</a>	4
bone morphogenetic protein 4	<i>BMP4</i>	TGGTAACCGAATGCTGATGG	CAAACATCTGCAGCAGAGTGG	<a href="#">NM_205237</a>	5
bone morphogenetic protein 5	<i>BMP5</i>	CTGTCCGAGCAGCCAACAATA	AATCCCCAACACTTGGCATCC	<a href="#">NM_205148</a>	3
bone morphogenetic protein 7	<i>BMP7</i>	TGAGCTTCGTAACCTTGGTGG	ATTATCGAAGCGTTTCGCGG	<a href="#">XM_417496</a>	20
bone morphogenetic protein receptor, type IA	<i>BMPRIA</i>	GATTGCTTGGAGCCTACTGTC	GGAATGGTAAGGTGTCCTCTGG	<a href="#">NM_205357</a>	6
bone morphogenetic protein receptor, type IB	<i>BMPR1B</i>	CTCAGGTACAAGCGGCAAGA	TGCTCGATCAGATCCTCAGG	<a href="#">NM_205132</a>	4
bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	<i>BMPR2</i>	AACAGTAATCCGTGCCAGTGC	TTCTAGTCTGAGTCTGCCAGG	<a href="#">NM_001001465</a>	7
claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein)	<i>CLDN11</i>	TCATCATCCTCCTGCCATGT	TAGCCGAAGCTCATGATGGTG	<a href="#">XM_422797</a>	9
coagulation factor II (thrombin) receptor	<i>F2R</i>	TGACCCGTTTTGTTCCTTCG	CGCTTACAACAGGACATCCG	<a href="#">XM_424799</a>	Z
cripto, FRL-1, cryptic family 1	<i>CFC1</i>	TGTGACTCTGATTGGCAGGC	TAGGCGATTGCTTTTGCGC	<a href="#">NM_204700</a>	Z
cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	<i>CYP11A1</i>	AACGTGCACAACATCATGGC	ATTACGCTCTCGTAGACACCC	<a href="#">NM_001001756</a>	10
cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	<i>CYP17A1</i>	CAAGTTTGGCGTTGTGCTG	AACAACCCCATCTCACCTCAC	<a href="#">NM_001001901</a>	6
cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	<i>CYP19A1</i>	TTGAGGTTTGGCATGTCATC	TGCTCTGATACTCTGTCCG	<a href="#">NM_001001761</a>	10



Nom du gène	Symbole du gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Numéro d'accèsion	Chromosome
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	<i>DDX4</i>	TCTTGTGGCAACTCGGTAGC	ACGACCAGTTCGTCCAATTGC	<a href="#">NM_204708</a>	Z
deleted in azoospermia-like	<i>DAZL</i>	GAACGATGTCTGCAAATGCG	ATCCTTGGCAGGTTGTTGAGC	<a href="#">NM_204218</a>	2
doublesex and mab-3 related transcription factor 1	<i>DMRT1</i>	ACGTTTTCTCCTCGTATCGCC	TGCTGGCCGTTATATTGC	<a href="#">NM_001101831</a>	Z
doublesex and mab-3 related transcription factor 3	<i>DMRT3</i>	GAGAACATCAATGAGGAGCGG	GCCACCATTTTTCTGAACTGC	<a href="#">XM_429193</a>	Z
early growth response 1	<i>EGRI</i>	CCAGCGAGCAACATTTGAG	TAGCCGTGTTGTTGGTTGG	<a href="#">NM_204136</a>	13
embigin homolog (mouse)	<i>EMB</i>	AGATCGCCATCAATGACTCCC	ATGCACCACCGTCTTCTTTGG	<a href="#">NM_204557</a>	z
epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	<i>EGFR</i>	TGACAACTCTTTTGCCTGGC	TCTGATAGCCGTTTCATTGGC	<a href="#">NM_205497</a>	2
estrogen receptor 1	<i>ESR1</i>	TGGTGTCTTGAAACGGC	TGTGGCGCTATTATCAGAGC	<a href="#">NM_205183</a>	3
estrogen receptor 2 (ER beta)	<i>ESR2</i>	GAGGTTTGTTCACAGGTGCG	AGCGACTGGAACAAATGGTGC	<a href="#">NM_204794</a>	5
fanconi anemia, complementation group G	<i>FANCG</i>	ACGACCTCTTGCGATTTGAGC	GCCCAATCAGAGAAAGCAACC	<a href="#">NM_204378</a>	Z
fibroblast growth factor 10	<i>FGF10</i>	AGACACGTGCGGAGTACAAT	ACCTTGCCGTTCTTCTCGAT	<a href="#">NM_204696</a>	Z
fibroblast growth factor 18	<i>FGF18</i>	GTCAGCAAAATATTCAGGCTGG	TTCTGTATCTCCACTTGCCCC	<a href="#">NM_204714</a>	13
fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	<i>FGF9</i>	CAATTCCTCACTTGAGCCCT	ATGCGACAAAGTTGGCAAC	<a href="#">NM_204399</a>	1
follicle stimulating hormone receptor	<i>FSHR</i>	TCACCTGCTGCTGATTCTCC	AATCTCAGTTCTGTGGCATTGG	<a href="#">NM_205079</a>	3
follicle stimulating hormone, beta polypeptide	<i>FSHB</i>	AGAAACAATGAACGCCATCTGC	ATCTTCTTTCCTTCCCCACC	<a href="#">NM_204257</a>	5
follistatin	<i>FST</i>	TGTTTGTGCTCCGATTGC	TGCACTTGCCCTGATATTGG	<a href="#">NM_205200</a>	z
follistatin-like 1	<i>FSTL1</i>	TGTGTTAGCAATGGCAAGACG	TGGCCATCGTAATCCACTTGG	<a href="#">NM_204638</a>	1
forkhead box L2	<i>FOXL2</i>	GAGCTGTCCGTCATGCACT	CTCCCTAGATGTCAATGCGG	<a href="#">NM_001012612</a>	9
forkhead box O1	<i>FOXO1</i>	GCACAGCGTAAAGACAACCACA	GCGCACAGCTTTGTCAAGAA	<a href="#">NM_204328</a>	1
forkhead box O3	<i>FOXO3</i>	ACAAACCGTGCACTGTGGAGT	TGGAGCTTCTGTCATCATCC	<a href="#">XM_001234495</a>	3
forkhead box O4	<i>FOXO4</i>	TGTACTCCAGTGCATCCAGCA	GGAAAAGCTGGAATCCCTCTG	<a href="#">XM_426261</a>	4
frizzled-related protein	<i>FRZB</i>	TCTTCCCTGGTGAACATCCC	TCATTGGCACTGAGTGGTGG	<a href="#">NM_204772</a>	7
galanin prepropeptide	<i>GAL</i>	TCAAGATGCAGAGGTGTGTGG	TTGCAGACAAAACCACTCCG	<a href="#">NM_001159678</a>	5

Nom du gène	Symbole du gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Numéro d'accèsion	Chromosome
gap junction protein, alpha 1, 43kDa	<i>GJA1</i>	TCTTCGTTTTCCCTTAACCC	TCCTCACTGGATATTGGCGC	<a href="#">NM_204586</a>	3
gap junction protein, beta 1, 32kDa	<i>GJB1</i>	GAGAAGAAGCTGCTGGTATGA	TCGAAGATCAGCCGGAAGA	<a href="#">NM_204371</a>	4
GATA binding protein 2	<i>GATA2</i>	AGCATCTCATTGGACATCCG	AGGTAAAGCCCCATGTTCTCG	<a href="#">NM_001003797</a>	12
GATA binding protein 4	<i>GATA4</i>	ACCACTGAGGAAATGCGCCCA	CGAAGATGCCTGAGAAATTG	<a href="#">XM_420041</a>	3
GATA binding protein 5	<i>GATA5</i>	GAACCCCCTTCTCCATTACG	CTCGAATTGAACTCGCCG	<a href="#">NM_205421</a>	20
GATA binding protein 6	<i>GATA6</i>	AGATGACTGTAGCAAAAACGCC	ACTTAAGGTTGCTGCTTTCGG	<a href="#">NM_205420</a>	2
glial cell derived neurotrophic factor	<i>GDNF</i>	ACTCCGATTTTTCTAGGCGG	TGCCCCTTTTGGTTCCCTC	<a href="#">XM_425018</a>	Z
gonadotropin-releasing hormone 1 (lutinizing-releasing hormone)	<i>GNRH1</i>	CATCTGTGGCAATCTGCTTGG	ATCAGGCTTGCCATGGTTCC	<a href="#">NM_001080877</a>	22
gonadotropin-releasing hormone receptor	<i>CGNRH-R</i>	TTACTCACGGTAGCTTCGAGC	CCAAATGATTGGACGTAGC	<a href="#">NM_204653</a>	10
gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	<i>GREM1</i>	TCTTGTTCCTTCTGCAAGCCC	TTCTCGGCTTAGTCCAAGTCG	<a href="#">NM_204978</a>	5
growth differentiation factor 2	<i>GDF2</i>	GCATAGGAGCAAACCACTGTG	TGAGGGGAAGAAGCAAC	<a href="#">NM_205432</a>	6
growth differentiation factor 9	<i>GDF9</i>	TCGTTTGACACCTCAGTTCCC	AAGCTACGGAGTGTGAAACGC	<a href="#">NM_206988</a>	13
growth hormone receptor	<i>GHR</i>	AGAGTCATGGCCACTTTTGC	TTCCACCTTGATTCTGCC	<a href="#">NM_001001293</a>	Z
heat shock factor binding protein 1	<i>HSBP1</i>	CGAATTGATGACATGAGCTGC	TTCCAGTTCTTACTCCCGC	<a href="#">NM_001112809</a>	11
heat shock protein 70	<i>HSP70</i>	GATCTTTCCGTGGTACCCTGG	TTAGGAATACGAGTGGAGCCCC	<a href="#">NM_001006685</a>	5
heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	<i>HSP90AA1</i>	GACCCGAGCAAGCTGGATTCT	ACAATGGTCAGAGTGGATCG	<a href="#">NM_001109785</a>	5
homeobox A7	<i>HOXA7</i>	TTGATCAGAACATTCCTGCC	GGAAATTAGCCTCAGCCTGGT	<a href="#">NM_204595</a>	2
homeobox A9	<i>HOXA9</i>	ACGGCATTAAACCTGAACCGC	CCTTCGTGGCTTTGCTTATCC	<a href="#">XM_001234943</a>	2
hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	<i>HSD3B1</i>	ACAGAAAGCCAGACACATCAGG	CAGCTCGTAATTTAGGTCTGCG	<a href="#">NM_205118</a>	1
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	<i>HSD17B4</i>	TTTGGGTGAACGTATTCGGC	GCGTCATGTGGATGTTGAAGG	<a href="#">NM_204943.1</a>	Z
inhibin, alpha	<i>INHBA</i>	CTTTGCAGAGACATTTGGTGC	TGTAGGTTGTTCTCGGTGTG	<a href="#">NM_001031257</a>	7
inhibin, beta A	<i>INHBA</i>	TCGAAAGAGCACTTGGCACA	ACATCCAAGGAGCTCTTGCT	<a href="#">NM_205396.1</a>	2
inhibin, beta B	<i>INHBB</i>	ACTTTTCCCATGACAGAGCGG	CAGCCCTCACATTGAACATCC	<a href="#">NM_205206</a>	unknown

Nom du gène	Symbole du gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Numéro d'accèsion	Chromosome
insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	<i>IGF1</i>	TCAACAGTCTTTCAACACAATTAGTTAAGT	ACACAGGCCAAGGTAGAAGAAATG	<a href="#">NM_001004384</a>	1
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	<i>IGF2</i>	TGTGCCAAGTCCGTCAAGTC	TTGGCATGAGATGGCTTCTG	<a href="#">NM_001030342</a>	5
insulin-like growth factor 2 receptor	<i>IGF2R</i>	ATTGTGACGGATCCCAACACC	TCGTGCCGATATCCATCTGG	<a href="#">NM_204970</a>	3
insulin-like growth factor binding protein 1	<i>IGFBP1</i>	CTATTTGCCCAACTGTAAACAAG	CAGCACCCAGCGAATCT	<a href="#">NM_001001294</a>	2
insulin-like growth factor binding protein 4	<i>IGFBP4</i>	AGCACCCCAACAACAGCTTCA	CCGTTGTGTATGCGCTTTG	<a href="#">NM_204353</a>	inconnu
Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	<i>JAK1</i>	ATCTGTTTCAGTTGCGTTGAGG	TCGCCACTGGTATAACAAATGG	<a href="#">NM_204870</a>	8
luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor	<i>LHCGR</i>	GTTCCAGACTTGACGCAGA	GCCTGAGGTTTTTGTGTCC	<a href="#">NM_204936</a>	3
nerve growth factor, beta polypeptide	<i>NGFB</i>	CTTTTTGATCGGCACACAGG	GGCAATGTGCTGTCCGTTACT	<a href="#">XM_418016</a>	26
neurotrophin 3	<i>NTF3</i>	GCAGGTGATGGATGTCAAGGA	TGGTGGAAGTCTGATTTCA	<a href="#">NM_001109762</a>	1
noggin	<i>NOG</i>	ATACACGTGGAACGATCTCGG	CGTTAAATGCACGGACTTGGC	<a href="#">NM_204123</a>	18
Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	<i>NOTCH1</i>	ATTCCCTACAAAATAGAGGCCG	CCGTCAGAAGCATTTTTGAGG	<a href="#">XM_415420</a>	17
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	<i>NR0B1</i>	GCAGAAGGAAGCACAGGAAGC	CAAGGATAGAACAACATT	<a href="#">NM_204593</a>	1
nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	<i>NR5A1</i>	TGGCTCCACTTTCATAGCACTTG	TCTACACAAGCCTGCCATCT	<a href="#">NM_205077</a>	17
nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	<i>NR5A2</i>	CTATGTAICTCATGGCCTATTC	CTTGCAATTGCTAATGCTGC	<a href="#">NM_205078</a>	8
paired box 2	<i>PAX2</i>	GCTCACAAAACACTGATCCCC	AAACAGGACGATGGTCACAGG	<a href="#">NM_204793</a>	6
paired box 5	<i>PAX5</i>	ATTACAGGAACCTCCAGTAC	CAGCTAATGATGCCATGGCT	<a href="#">NM_204424</a>	Z
paired-like homeodomain 2	<i>PITX2</i>	GTACCTCTGGTGGATGCAAAGA	GTGTCGGCTGAAAAGTAAAACG	<a href="#">NM_205010</a>	4
platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	<i>PDGFRA</i>	GGAATGGTTGGTTGCAAGG	CATATTCCTCTCATCCAGTGG	<a href="#">NM_204749</a>	4
progesterone receptor	<i>PGR</i>	TCCAGTACAGCTTGAATCGC	ATGCAGTCATTCTCCAGCAC	<a href="#">NM_205262</a>	1
ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	<i>RNH1</i>	AGCCTGAGTAACAACACGCTGG	TGTCCCGATCTTGTATCCC	<a href="#">NM_001006473</a>	5
similar to hypothetical protein MGC42105	<i>LOC427192</i>	GTTTGACAGTGTGCGTTACG	ATAGCGGTGCTTCCAAGACC	<a href="#">CR406079</a>	Z
similar to Intraflagellar transport 74 homolog (Coiled-coil domain-containing protein 2) (Capillary morphogenesis protein 1) (CMG-1)	<i>LOC427367</i>	GTTGACAGGAGAATGAGACCCA	TCGCTTTTTCCCTACTGGCT	<a href="#">XR_027214</a>	Z

Nom du gène	Symbole du gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Numéro d'accèsion	Chromosome
similar to NALP1	<i>LOC416998</i>	ACCAGTGGATGCTCTATTGCC	GTAACCTTCTCCAAACCAACCCC	<a href="#">XM_415289</a>	15
slit homolog 1 (Drosophila)	<i>SLIT1</i>	TTTGTAGCGGAGTTGGTGTCG	GCTCGTTTGTGGATTGTC	<a href="#">XM_421715</a>	6
SMAD family member 1	<i>SMAD1</i>	TGGAAACAATTGAGCCTTGC	CCCCAAATCCAACAGTTGG	<a href="#">XM_420428</a>	4
similar to SMAD family member 2	<i>LOC769000</i>	GGACACAACAGGCCTTACAGC	ATGCGGTAGTCTTACGATGC	<a href="#">NM_204561</a>	Z
SMAD family member 6	<i>SMAD6</i>	AGAGCTGGATTATGCAGACGG	AACTGTCTCGAGTAAACACGGCC	<a href="#">NM_204248</a>	10
SMAD family member 7	<i>SMAD7</i>	CCAGGTATCCCATGGATTCC	TTAGTCCCCCTGTTCAGTGG	<a href="#">XM_427238</a>	6
somatostatin	<i>SST</i>	GAAGCAGGAAGTGGCCAAGTA	TCCGACTCCAGAGCTTCATTT	<a href="#">NM_205336</a>	9
SRX (sex determining region Y)-box 9	<i>SOX9</i>	AACTOCCACATCGATTCC	CGTCGAAGGTTTCGATGTGG	<a href="#">NM_204281</a>	18
steroidogenic acute regulator	<i>STAR</i>	AAGTGATGGCCCTTATCTCGG	TGGCTGCTACAAACACTGCTG	<a href="#">NM_204686</a>	22
TIMP metalloproteinase inhibitor 2	<i>TIMP2</i>	GGAACCCCATCAAGCGAAT	GGCGCCGTGTAGATGAATT	<a href="#">NM_204298</a>	unknown
TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	<i>TIMP3</i>	TGGCCTGTGCAATTGGTATG	AATCTTGCATCCACAGCCCAG	<a href="#">NM_205487</a>	1
transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	<i>TGFBR2</i>	AGACTGCAGCGATGTTTGTGC	GGCAGCAATTCTGTGTTGTGG	<a href="#">NM_205428</a>	2
transforming growth factor, beta receptor III	<i>TGFBR3</i>	ACAGTTACACCCAGTCCATGC	ACATGCACCTCTTGTGGTAGGC	<a href="#">NM_204339</a>	8
tsukushin	<i>TSKU</i>	AGAGAAGGAGGTCAACGATGC	AGCTGTGGAAGAGACCAAAGC	<a href="#">NM_001005346</a>	1
v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	<i>KIT</i>	TGCTACAGATCATTGGTGAGG	CACTCAAACATCTTCGGTACC	<a href="#">NM_204361</a>	4
wingless-type MMTV integration site family, member 4	<i>WNT4</i>	ACCTCCATAAACAAATGAGGCGG	CCGTCGAATTTCTCTTCAGC	<a href="#">NM_204783</a>	21
Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	<i>WHSC1</i>	AAACACGAAGACCCCATGAGC	TCATGCATTCCAGTCGTGAGC	<a href="#">XM_420839</a>	4
gallus gallus DNA, male hypermethylated (MHM) region on the Z chromosome	<i>MHM</i>	TGGCTCTGCATTTTGTGGC	TGACTGTGCTTATGTGGTGGC	<a href="#">AB046699</a>	Z
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	<i>EEF1A</i>	AGCAGACTTTGTGACCTTGCC	TGACATGAGACAGACGGTTGC	<a href="#">NM_204157</a>	3
ribosomal protein L15	<i>RPL15</i>	TGIGATGGGTTTCTCTCTGG	CCATAGGTTGCACCTTTGGG	<a href="#">XM_426002</a>	2



# Gwenn-Aël Carré

## Analyse de profils d'expression génique au cours de la différenciation gonadique chez le poulet.

### Résumé

Chez le poulet, le déterminisme du sexe est génétique (ZZ/ZW) mais à la différence des mammifères le déterminant majeur du sexe n'a pas été identifié. Néanmoins, un certain nombre d'acteurs moléculaires impliqués en aval dans la différenciation du testicule (*DMRT1*, *AMH*, *SOX9*...) ou de l'ovaire (*CYP19A1*, *FOXL2*, *RSP01*...) ont été identifiés. D'autre part, le modèle poulet présente deux particularités que sont l'asymétrie du développement ovarien et la sensibilité aux stéroïdes donnant la possibilité d'inversions du sexe par des hormones exogènes. Par une analyse par PCR en temps réel à moyen débit, nous avons identifié des gènes dont l'expression est sexuellement dimorphique et/ou asymétrique au cours de la différenciation gonadique. Parmi ces gènes plusieurs membres de la famille des bone morphogenetic protein sont préférentiellement exprimés dans l'ovaire en comparaison au testicule. L'étude des effets de BMP4 sur la culture organotypique d'ovaires ou de testicules a montré qu'il était un inhibiteur de la stéroïdogénèse basale et induite par la FSH et d'autre part qu'il est un inhibiteur de l'expression de l'AMH. Résultats qui nous ont amené à émettre l'hypothèse que BMP4 était un facteur « anti-testiculaire ».

Mots clés : poulet, gonade, différenciation, gènes, BMP, stéroïdes.

### Abstract

In chicken, sex is determined by a ZZ/ZW sex chromosome system, where the female is heterogametic (ZW). However, the mechanism involved in the sex determination is still unknown. Several genes involved in testicular (*DMRT1*, *AMH*, *SOX9*...) or in ovarian (*CYP19A1*, *FOXL2*, *RSP01*...) differentiation have been identified. Furthermore, gonadal development in chicken embryos presents two particularities which are the asymmetrical ovarian development and the sensitivity to exogenous hormones leading to sex reversal. By real-time PCR analysis, we have identified several genes whose expression is sexually dimorphic and/or asymmetric. In particular, we showed that several members of bone morphogenetic protein family are preferentially expressed in the ovary compared to the testis. Using organotypic culture of embryonic ovaries and testes, we showed that BMP4 inhibits the basal and FSH induced steroidogenesis and is an inhibitor of *AMH* mRNA expression. These findings lead us to propose that BMP4 is an "anti-testicular" factor.

Key words: chicken, differentiation, gonads, BMP, steroids, genes.