HAL open science

mémoire HDR

Marina Govoroun

▶ **To cite this version:**

Marina Govoroun. mémoire HDR. Sciences du Vivant [q-bio]. Université François Rabelais, Tours, 2015. tel-03369673

HAL Id: tel-03369673

https://hal.inrae.fr/tel-03369673

Submitted on 7 Oct 2021

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

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

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

UNIVERSITÉ FRANÇOIS-RABELAIS

DE TOURS

Année Universitaire : 2014-2015

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Discipline : Science de la vie et de la santé.

présentée et soutenue publiquement

par :

Marina GOVOROUN

Le 11 mars 2015

JURY :
(Par ordre alphabétique)

Mme Elisabeth Blesbois	Ingénieur de Recherche, HDR	INRA, TOURS
Mme Helena D'Cotta	Directeur de Recherche	CIRAD Montpellier
Mme Anne Duittoz	Professeur des Universités	Université de Tours
Mr Stéphane Flament	Professeur des Universités	Université de Lorraine
Mme Anne-Sophie Martinez	Maitre de conférences, HDR	Université de Caen Basse-Normandie
Mr Reiner Veitia	Professeur des Universités	Université Paris 7

Sommaire

Avant –propos 0

1. Biochimie des hormones glycoprotéiques - Elaboration de nouvelles approches chromatographiques 1

2. Développement gonadique 2

2.1 Etude des mécanismes moléculaires de la différenciation gonadique chez les poissons 2

2.2 Construction de la banque multi- tissus normalisée et ordonnée de la truite arc-en-ciel 4

2.3 Développement gonadique chez le poulet 4

- Contexte agronomique 4
- Contexte scientifique 5

2.3A Identification des gènes impliqués dans la compétence ovocytaire chez la poule 5

- Introduction 5
- Rappel des particularités de l'ovogénèse et du développement précoce chez la poule 7
- Gènes Ovocytaires chez la poule (publications 19, 37, 40, 42) 11
- Les gènes ovocytaires et la fertilité chez la poule (publication 20) 16
- Perspectives des travaux réalisés sur l'identification des gènes impliqués dans la compétence ovocytaire et le développement embryonnaire précoce et des gènes corrélé à la fertilité 20

2.3B Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation gonadique chez le poulet 22

- Les particularités de la différenciation et du développement gonadique chez l'oiseau 22

- Identification des gènes potentiellement impliqués dans la différenciation gonadique chez le poulet 24
- FOXL2 est un gène majeur de la différenciation ovarienne chez le poulet (publication 16)……... ..... … 24
- Identification de nouveaux acteurs impliqués dans la différenciation chez le poulet (Publication 21) 27
- Etude de la fonction des gènes durant la différenciation gonadique chez le poulet, exemple de BMP4 et FSH (publication 39, 41 et en préparation pour soumission) 34
- Cultures organotypiques des gonades embryonnaires du poulet et perturbateurs endocriniens 44

Perspectives 44

- Les Cellules Germinales Primordiale Aviaires (CGPs) 47
- Etude du rôle des BMPs et de l'Activines dans la différenciation des CGPs aviaires 49
- Les facteurs impliqués dans l'identité sexuelle phénotypiques des CGPs 52
- Impact de la cryopréservation des cultures de longue durée sur la qualité et des CGPs ……...52
- Contexte gonadique et transmission germinale des CGPs 54
- Les cultures des CGPs aviaires in vitro comme modèle d'avenir pour l'écotoxicologie 54

Conclusions 56

Liste de publication 57

Curriculum vitae 71

Liste des activités d'encadrement des étudiants 74

Participation aux contrats de recherche 75

PRESENTATION DE L'ACTIVITE SCIENTIFIQUE

Avant-propos

Mes travaux de recherche depuis ma thèse jusqu'à présent ont été centrés sur des domaines touchant la reproduction animale. Lors de ma thèse que j'ai réalisée à l'Institut de la Biotechnologie Agricole de Russie à Moscou je me suis intéressée à la biochimie et l'immunochimie comparée des hormones gonadotropes des différentes espèces des vertébrés avec un objectif finalisé d'élaboration de nouveaux procédées de leur purification et détection. Ces hormones qui contrôlent l'ovogénèse et la spermatogénèse sont très importantes pour les recherches en biologie de reproduction et ont de larges applications en médecine et agriculture. Durant ma thèse je me suis particulièrement intéressée aux gonadotrophines des poissons présentant plusieurs particularités en comparaison avec celles des mammifères. Pour cette raison j'ai choisi SCRIBE (le laboratoire de physiologie des poissons de l'INRA de Rennes à l'époque) pour réaliser mon étude postdoctorale sur la purification et la détection d'une nouvelle gonadotropine GTH1 (identifiée plus tard comme FSH chez les poissons) chez la truite –arc-en-ciel. Mon travail sur la purification de la GTH1 (FSH) et GTH2 (LH) chez la truite arc-en-ciel et le développement de leur dosage radioimmunologique ont permis de développer au SCRIBE la recherche sur le rôle et la régulation des hormones gonadotropes chez la truite arc-en-ciel, recherche qui continue jusqu'à présent. J'ai par la suite étendu mes travaux aux gonadotropines du salmon chinook et de l'esturgeon au SCRIBE (INRA de Rennes) et au Laboratoire de Biologie de la Reproduction des Poissons (Université de Bordeaux I) en adaptant les procédés de purification que j'ai précédemment élaborés. A partir de l'année 1998 j'ai eu une opportunité d'intégrer le projet européen sur les mécanismes moléculaires de la différenciation gonadique naturelle et induite par les stéroïdes sexuels ou la température chez la truite-arc-en ciel et le tilapia. J'y ai abordé la biologie du développement du système reproducteur et acquis des compétences en biologie moléculaire que j'ai ensuite approfondies et complétées par de la génomique expressionnelle dans le programme national ASTEROGER. Ce programme abordait pour la première fois dans leur globalité les transcriptomes de quatre espèces modèles d'intérêt agronomique : bovin, porc, poulet, truite-arc-en-ciel et qui visait la construction, le séquençage et la caractérisation des banques multi-tissus normalisées de ces animaux. Dans ce programme j'ai construit la banque multi-tissus normalisée de la truite arc-en-ciel. En 2001 j'ai intégré l'équipe « Qualité des gamètes et des embryons » de l'Unité de Recherche Avicole en tant que CR1 et j'ai développé des travaux sur le développement gonadique de l'embryon et le développement ovocytaire chez le poulet. Forte de mon expérience sur les gonades et les gamètes, j'ai récemment recentré mon activité sur les cellules germinales embryonnaires aviaires et leurs interactions avec leur environnement gonadique *in vitro* et in *vivo*. afin d'une part de mieux comprendre les processus de différenciation menant aux gamètes mâles ou femelles et d'autre part développer des cultures de cellules germinales primordiales utiles pour la gestion *ex situ* des ressources génétiques dans le cadre de la nouvelle Infrastructure de Recherche National CRB ANIM. Je poursuis également l'étude des mécanismes

moléculaires impliqués dans la différenciation et le développement gonadique chez l'oiseau. De 2010 à 2012 j'ai co-animé avec F. Guillou l'équipe Testicule, Ontogénèse, Métabolisme Energétique (TOME), puis après la restructuration de cette équipe que je co-anime avec Elisabeth Blesbois depuis 2013 une nouvelle équipe « Gonade, conservation, régénération». J'ai choisi de présenter ci-dessous mes travaux essentiellement dans l'ordre chronologique avec une présentation à la fin des perspectives de mes recherches. Je présente brièvement les travaux que j'ai réalisés avant d'intégrer en 2001 l'unité de Recherche Avicole et plus en détail ceux que j'ai réalisés sur la différenciation gonadique, la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire précoce chez le poulet, thèmes sur lesquels j'ai encadré des étudiants en thèse et qui sont plus proches de mon projet de recherche actuel.

1. Biochimie des hormones glycoprotéiques - Elaboration de nouvelles approches chromatographiques

Les hormones gonadotropes appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques et sont produites par l'hypophyse de tous les vertébrés. Ces hormones dans leur forme biologiquement active possèdent une structure dimérique. L'association non covalente de la sous-unité α avec une des quatre différentes sous-unités β forme quatre hormones différentes : l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculostimulante (FSH), l'hormone chorionic (hCG) et l'hormone thyroidostimulante (TSH). Les deux premières sont les principales régulatrices du cycle reproducteur chez les vertébrés. L'hCG se différencie des trois autres hormones puisqu'elle est synthétisée par le placenta chez l'humain et chez certains mammifères. Leur utilisation importante en agriculture, médecine et recherche biomédicale nécessitait la production de préparations purifiées. D'autre part, l'importance des fonctions régulatrices de ces hormones dans l'organisme font qu'elles représentent un objet de recherche important.

Lors de ma thèse à l'institut de Biotechnologie Agricole de Russie puis de séjours postdoctoraux au SCRIBE (INRA de Rennes) et à l'Université de Bordeaux I, je me suis intéressée aux propriétés immunochimiques des hormones glycoprotéiques des différents vertébrés et au développement de nouvelles méthodes de purification de ces hormones. A l'époque, les techniques existantes permettaient l'obtention de ces hormones avec un assez grand degré de pureté, mais restaient relativement lourdes à mettre en œuvre. D'autre part une nouvelle hormone GTH1 avait été découverte chez quelques poissons téléostéens et semblait remplir les fonctions de la FSH des vertébrés terrestres mais était très difficile à purifier et à détecter à cause de ses propriétés particulières, notamment de la présence d'une forme stable, produit d'association entre les sous-unités α et β et complétement résistant à la température, à l'urée et au chlorure de guanidium, (agents utilisés selon le modèle pour dissocier ces hétéromères). Cette forme stable n'était pas connue dans les hormones glycoprotéiques auparavant. Concernant les nouvelles méthodes de fractionnement de ces hormones j'ai principalement exploré d'une part la capacité des colorants immobilisés d'adsorber d'une manière différentielle la fraction totale des hormones glycoprotéiques et les autres protéines hypophysaires et d'autre part l'utilisation de chromatographie

d'affinité sur chélateurs des métaux (IMAC pour immobilysed metal affinity chromatography) pour séparer la FSH de la LH chez les salmonidés. Ici l'objectif était de simplifier les protocoles de fractionnement existants et de séparer la GTH1 (FSH) et la GTH2 (LH) chez la truite-arc-en-ciel avec le meilleur rendement possible, la truite arc-en-ciel étant le modèle d'étude principal au SCRIBE. Nous avons pu démontrer que la chromatographie sur les colorants immobilisés en particulier sur Cibacron blue F3GA était une méthode très puissante pour la purification de certaines hormones glycoprotéiques comme la LH et la FSH porcines, la LH et la TSH bovines, la LH de l'esturgeon, la LH et la FSH de la truite. En s'appuyant sur le fait que le nombre et la distribution des histidines est différent dans la LH et la FSH de salmonidés nous avons pu séparer pour la première fois ces deux hormones chez la truite arc-en-ciel en utilisant IMAC (publication **3**). Cette méthode basée sur l'affinité des protéines pour les métaux chélatés dépend de la densité et de l'accessibilité des résidus histidines dont l'immidazole est considéré comme le donneur principal d'électron. Dans la continuité de ce travail, j'ai isolé les sous-unités de la LH et de la FSH chez la truite arc-en-ciel et mis en place des dosages spécifiques radioimmunologiques de ces hormones (publication **6**). Ces dosages ainsi que les hormones que j'ai purifiées ont permis ces 20 dernières années l'étude des rôles de la FSH et de la LH au cours du cycle reproducteur chez la truite arc-en-ciel. Grâce à ces dosages, nous avons pu décrire l'évolution des taux plasmatiques de LH et de FSH au cours du cycle reproducteur annuel chez la truite arc-en-ciel ainsi que leur modulation par GnRH et les stéroïdes et préciser ces profils au cours de la période préovulatoire (publications **4, 5, 7**).

J'ai également purifié et caractérisé une nouvelle gonadotropine (GTHX) chez l'esturgeon. J'ai pu montrer que GTHX était un dimère très stable de deux sous-unités α (alpha1 et alpha2) capable de stimuler la maturation ovocytaire *in vitro.* L'existence de ce dimère de deux sous-unités α trouvées chez ce poisson ancestral pourrait refléter l'état primitif du système gonadotrope dans l'évolution (publication **26**) et sa fonction biologique mériterait d'être étudiée d'une manière plus détaillée.

2 Développement gonadique.

2.1 Etude des mécanismes moléculaires de la différenciation gonadique chez les poissons.

Dans le cadre d'un projet Européen collaboration avec Y. Guiguen au SCRIBE (INRA de Rennes), je me suis intéressée aux mécanismes moléculaires de la régulation du sexe chez les poissons en utilisant essentiellement comme modèle la truite arc-en-ciel. Ce travail m'a permis d'acquérir les connaissances sur la différenciation du sexe et le développement gonadique ainsi que de m'initier à de nombreuses techniques de biologie moléculaire. Le contrôle phénotypique du sexe en aquaculture représente un enjeu économique considérable. La production des populations monosexes permet de privilégier le sexe des poissons avec les performances de croissance les plus intéressantes et avec une meilleure qualité de la chair (ex. les femelles sont plus intéressantes de ce point de vue chez la truite et les mâles chez le tilapia). Cette production est également intéressante pour la gestion de la densité dans

certains élevages et de la surpopulation par les espèces indésirables dans les milieux naturels. L'acquisition des connaissances sur les gènes impliqués dans la différenciation du sexe, naturelle ou induite par les stéroïdes, est fondamentale pour la gestion des sex-ratios en pisciculture. Les stéroïdes jouent un rôle crucial dans la différenciation sexuelle chez l'ensemble des vertébrés non-mammaliens. D'après Yamamoto (Yamamoto 1969) les stéroïdes seraient les inducteurs du sexe naturel chez les poissons, les estrogènes étant considérés comme gynoinducteurs et les androgènes comme androinducteurs. Les travaux récents montrent cependant que ces stéroïdes se situent en aval d'une cascade moléculaire conduisant à la différenciation sexuelle, mais ils jouent un rôle central dans ce processus. Dans mes recherches je me suis intéressée à l'expression des gènes codant pour les enzymes de la stéroidogénèse ainsi qu'aux facteurs de transcription pouvant être impliqués dans la différenciation du sexe naturelle ou induite par les stéroïdes chez les poissons. Nous avons montré que durant la différenciation naturelle, l'expression gonadique des gènes codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse des stéroïdes débute avant la différenciation histologique des gonades. Cette expression est non spécifique du sexe pour les gènes codant pour les cytochromes P450scc, P450c17 et 3βHSD impliqués dans la synthèse de la progestérone et la 17-hydroxyprogestérone. Elle est femelle spécifique pour la P450 aromatase (P450aro) impliquée dans la synthèse des estrogènes et mâle spécifique pour la 11β-hydroxylase (P45011β) impliquée dans la synthèse des androgènes oxygénés (publication **10**, **11**)

Les traitements stéroïdiens sont largement utilisés en aquaculture pour inverser d'une manière fonctionnelle le sexe phénotypique. Chez la truite arc-en-ciel les traitements par un stéroïde naturel à faible dose la 11β-hydroxyandrostendione et par le 17β-œstradiol sont utilisés pour masculiniser ou féminiser efficacement le sexe phénotypique des poissons. Cependant les mécanismes moléculaires de ce phénomène étaient largement méconnus. Nous avons pu montrer que la masculinisation des femelles génétiques par les androgènes 11-oxygénés passait par l'inhibition de l'expression de la *P450aro* et non par la stimulation de la *P45011β* dont les niveaux restaient indétectables après le traitement. Ces données suggèrent que cette masculinisation passait plutôt par l'inhibition de la voie femelle que par la stimulation de la voie mâle (publication **11**). D'autre part la féminisation par l'oestradiol-17β inhibait l'expression de plusieurs enzymes de la stéroidogenèse (*P450c17*, *3βHSD*, *STAR*) et en particulier la *P45011β*, mais ne stimulait pas l'expression de *P450aro*, suggérant que cette féminisation passait plutôt par inhibition de la voie mâle sans activation de la voie femelle (publication **12**). Nous avons identifié chez la truite arc-en-ciel le gène DMRT1, très conservé, impliqué dans la différenciation testiculaire et nous avons montré que son expression était spécifique de la différenciation testiculaire. Ce gène n'était pas stimulé par les traitements masculinisant mais était inhibé par le traitement féminisant, confirmant notre hypothèse que la masculinisation et la féminisation par les stéroïdes sexuels respectifs, passaient plutôt par l'inhibition de la cascade moléculaire des mâles et des femelles respectivement et non par la stimulation d'une nouvelle voie moléculaire (publication **9**). Les recherches développées au SCRIBE par l'approche « gènes-candidats » à haut débit et par l'approche transcriptomique après mon départ ont complétement confirmé cette hypothèse en ce qui concerne le processus de masculinisation (Baron*, et al.* 2007). En ce qui

concerne la féminisation, l'étude des profils d'expression d'un grand nombre de gènes a permis de confirmer le fait que la synthèse des estrogènes n'est pas stimulé par le traitement féminisant, mais par contre l'expression d'autres gènes de la voie femelle comme *foxl2*, *fst*, *bmp4* était rapidement stimulés par le traitement et que l'inhibition de la voie mâle n'était que partielle (Vizziano-Cantonnet*, et al.* 2008).

2.2 Construction de la banque multi- tissus normalisée et ordonnée de la truite arc-en-ciel.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du programme national Astéroger ayant pour but de créer pour la première fois les outils transcriptomiques pour étudier l'expression des génomes des animaux d'élevage (4 espèces ont été choisies : le porc, la poule, le bovin et la truite arc-en-ciel) dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. Dans ce cadre, il était proposé de construire des banques multi-tissus normalisées et ordonnées de ces espèces et ensuite de réaliser leur séquençage systématique et la production des macro et microarrays. J'ai pris en charge la construction de la banque chez la truite arc-en-ciel au SCRIBE (INRA de Rennes) en collaboration avec F. Le Gac et Y. Guiguen (publication **17**). La réalisation de ce programme a permis de positionner la truite arc-en-ciel en terme d'ESTs (expressional sequence tags) disponibles comme un des modèles majeurs chez les poissons téléostéens après le poisson zèbre *danio rerio* et de développer des travaux de génomique expressionnelle chez cette espèce par différentes équipes de recherche. Ce travail a notamment permis de développer les recherches présentées ci-dessus sur la différenciation du sexe chez la truite arc-en-ciel naturelle et induite par les stéroïdes à une plus grande échelle en utilisant des approches génomiques (Baron *et al.* 2007; Vizziano-Cantonnet *et al.* 2008).

Mon implication forte dans ce projet m'a permis de me familiariser encore plus avec les méthodes de biologie moléculaire et de participer à l'initiation des approches génomiques naissantes. Cette expérience m'a aidée dans le développement des approches génomiques dans mes travaux ultérieurs sur le développement gonadique chez le poulet.

2.3 Développement gonadique chez le poulet.

Contexte agronomique. La production avicole de viande et d'œuf est une des premières sources de protéines dans l'alimentation humaine. La sélection intensive au cours du 20ème siècle a permis le développement de lignées avec des performances optimisées pour les productions spécifiques (œufs ou viande). Cependant la sélection des poulets de type chair sur les paramètres de croissance est inversement corrélée avec leurs performances de reproduction chez les deux sexes. Par exemple le ratio mâle/femelle nécessaire pour le maintien des standards de la production des poulets de chair et la fréquence de remplacement du coq durant la période de reproduction ont évolué du 1965 à 1996 de 1/15 à 1/10 et de 0 à 2 respectivement (Hammerstedt 1999). Une lignée « consommation résiduelle » sélectionnée sur l'engraissement et présentant une anomalie du métabolisme mitochondrial est un exemple de la

subfertilité chez le mâle liée à des facteurs génétiques (Morisson*, et al.* 1997). Du coté femelle, les femelles des lignées type chair présentent des séries de ponte irrégulières, le syndrome des œufs déficients, l'absence de hiérarchie folliculaire, une diminution de la durée de la période de reproduction, une baisse de nombre d'œufs pondus et de la fertilité sans réelle identification des causes (Brillard 2004). Le taux trop élevé de la mortalité embryonnaire reste aussi un défi important dans ces élevages. La qualité de l'ovocyte est supposée être un facteur majeur de la qualité de l'embryon comme cela a été montré chez d'autres espèces (Naz&Rajesh 2005). Une meilleure connaissance des facteurs de reproduction du côté femelle et mâle impliqués dans la fertilité des gamètes et dans la qualité de l'embryon est nécessaire pour les prendre en compte dans les schémas de sélection. Chez les espèces avicoles, notamment chez la poule, la maîtrise des facteurs influençant le sex ratio et le développement embryonnaire présente un fort intérêt économique. En effet un des deux sexes est systématiquement détruit dans les productions spécifiques (ex : les femelles dans la production du foie gras, les mâles dans la production des œufs de consommation) ce qui génère des pertes économiques et des problèmes éthiques. Une meilleure connaissance des aspects de la différenciation du sexe chez l'oiseau est nécessaire pour pouvoir maitriser un jour le sexe dans les élevages avicoles.

Contexte scientifique. En dehors du contexte économique, le poulet est un modèle très intéressant et original pour la recherche fondamentale notamment en ce qui concerne le développement embryonnaire et la différenciation gonadique. Les stades du développement embryonnaire du poulet sont bien connus et décrits d'une manière très précise, le génome du poulet est séquencé et assemblé depuis quelques années. Plusieurs particularités du développement embryonnaire (l'œuf télolécithe, début d'expression du génome embryonnaire au stade de ~30000 cellules…) et de la différenciation gonadique (l'hétérogamétie portée par la femelle, l'asymétrie du développement ovarien…) par rapport aux autres vertébrés en font un modèle unique. Depuis mon recrutement en 2001 en tant que CR1 dans l'équipe « Qualité des gamètes et des embryons » (actuellement équipe «Gonade, Conservation, Régénération») de l'Unité de Recherche Avicole (URA) jusqu'à 2006 puis de l'UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportement (PRC) de l'INRA de Tours sur le profil « développement précoce chez l'oiseau, mise en place et expression du génome embryonnaire » mes recherches ont été principalement centrées sur des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation gonadique chez l'embryon de poulet. D'autre part j'ai également apporté mon expertise à l'étude des bases moléculaires de la compétence ovocytaire chez la poule.

2.3A Identification des gènes impliqués dans la compétence ovocytaire chez la poule.

Introduction

Au contraire de certains facteurs affectant la qualité des gamètes mâles aviaires, les aspects « femelle » de la qualité des gamètes ont peu été explorés. Pour cette raison nous avons décidé d'aborder

Phase D'caccroissemant	AGE	Duré	Diamétre du follicule (mm)	Poids du follicule	Stade du développement des follicules	Nombre de follicules
Accroissement lent	1 jours		0,01		Follicules primordiaux	Quelques milliers
	6 semaines		0,05			
	18 semaine		0,8-1		Follicules primaires	
Accroissement intermédiaire		50 jours	2 ↓ 4		Préhiérarchiques : petits follicules blancs	Quelques centaines
Grand accroissement		3 jours	5 ↓ 9		Préhiérarchiques : petits follicules jaunes	5-6
		5 jours	10 ↓ 35		Follicules hiérarchiques	5-6

un de ces aspects ; la compétence ovocytaire qui comprend la capacité de l'ovocyte à reprendre la méiose

Tableau 1. Phases du développement folliculaire chez la poule d'après Sauveur (Sauveur 1988) et Johnson & Woods (Johnson 2007)

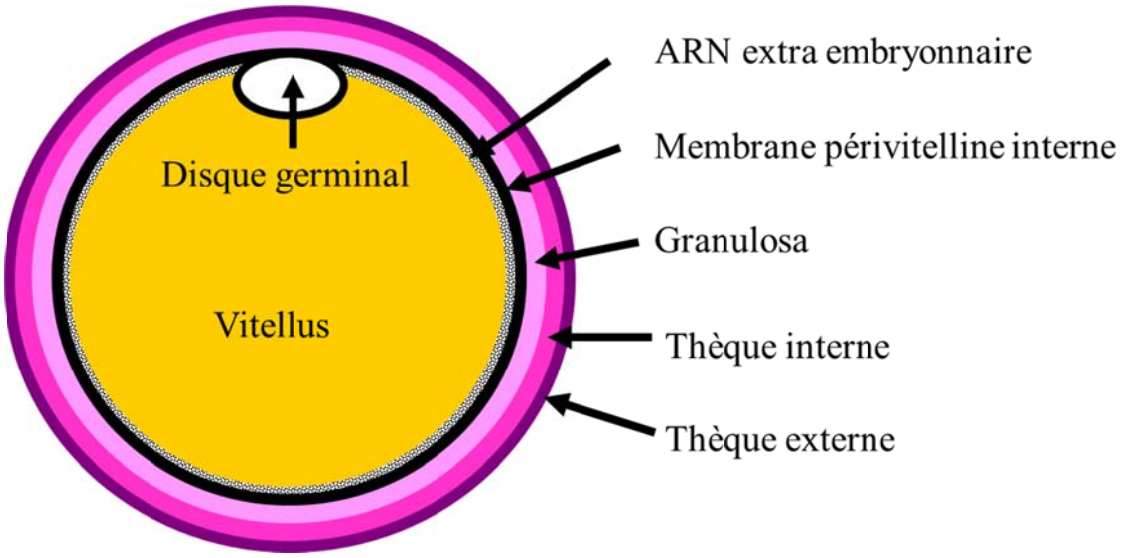


Figure 1. Structure du follicule chez la poule

chez l'adulte, à la poursuivre jusqu'en métaphase II, à être fécondé avec succès et à assurer le développement embryonnaire jusqu'à l'éclosion d'un poussin sain. Plus particulièrement notre recherche était ciblée sur l'identification des gènes à effet maternel, domaine qui n'avait jamais été exploré chez les espèces aviaires auparavant. Effectivement la présence de vitellus (ou jaune), qui constitue la plus grande partie de l'ovocyte aviaire en particulier durant les dernières étapes de maturation, rend délicate l'étude moléculaire et histologique du fonctionnement ovocytaire et du développement de l'embryon précoce. Ce travail a été initié en collaboration avec F. Batellier et a été réalisé essentiellement dans le cadre de la thèse de S. Elis que j'ai co-encadré avec E. Blesbois, P. Monget et F. Batellier.

Rappel des particularités de l'ovogénèse et du développement précoce chez la poule. A la différence des poissons, amphibiens et certains reptiles chez qui les ovogonies continuent à proliférer après l'éclosion et après la puberté, chez les oiseaux comme chez les mammifères les ovogonies subissent un nombre limité de divisions mitotiques dans les gonades embryonnaires avant d'entrer en première division méiotique où ils seront bloqués jusqu'aux dernières étapes de la maturation. Ainsi chez les oiseaux le stock des ovocytes primaires bloqués en diplotène est constitué à l'éclosion en nombre approximatif de 480000 chez la poule et ne sera pas renouvelé au cours de la vie. Une faible proportion d'entre eux (200-500 chez les oiseaux domestiques et encore moins chez les oiseaux sauvages) atteignent le stade préovulatoire. La formation des follicules primordiaux commence peu de temps après l'éclosion par le recrutement des cellules de granulosa qui formeront la membrane périvitelline autours des ovocytes. La formation des follicules primaires est associée au recrutement des cellules de la thèque à partir du mésenchyme. Ces cellules sont séparées des cellules de granulosa par la membrane basale. La synthèse des différentes étapes de l'ovogénèse chez la poule et leur durée sont présentées dans le **Tableau 1** et la structures du follicule de la poule sur la **Fig. 1**. Durant la croissance folliculaire l'ovocyte augmente sa taille environ 1000 fois. Une telle croissance est associée à l'absorption par l'intermédiaire des cellules de granulosa des composants du jaune. Durant la croissance jusqu'au stade pré-hiérarchique l'ovocyte accumule le jaune blanc riche en lipoprotéines. Durant cette étape, la thèque se différencie en deux couches avec des profils de synthèse de stéroïdes différents : thèque interne, impliquée principalement dans la synthèse des androgènes et thèque externe impliquée dans la synthèse des estrogènes. Le stade des follicules hiérarchiques est caractérisé par une croissance rapide due à l'absorption de grande quantité de vitellogénine et des lipoprotéines de très basse densité. Les dernières étapes de l'ovogénèse chez la poule sont caractérisées par une hiérarchie folliculaire strict, ou la taille du follicule détermine son degré de maturité : plus il est proche de l'ovulation, plus le follicule est grand. Le noyau et les organelles dans l'ovocyte aviaire sont situés dans une structure appelé le disque germinal dont la taille relative à l'espace occupé par le jaune devient de plus en plus petite au cours des dernières

étapes de l'ovogénèse. Comme chez les autres vertébrés, la maturation ovocytaire dépend du dialogue permanent entre l'ovocyte et les cellules de granulosa, d'une régulation paracrine et endocrine incluant les hormones gonadotrope la FSH et la LH, les stéroïdes, les facteurs de croissance et les hormones

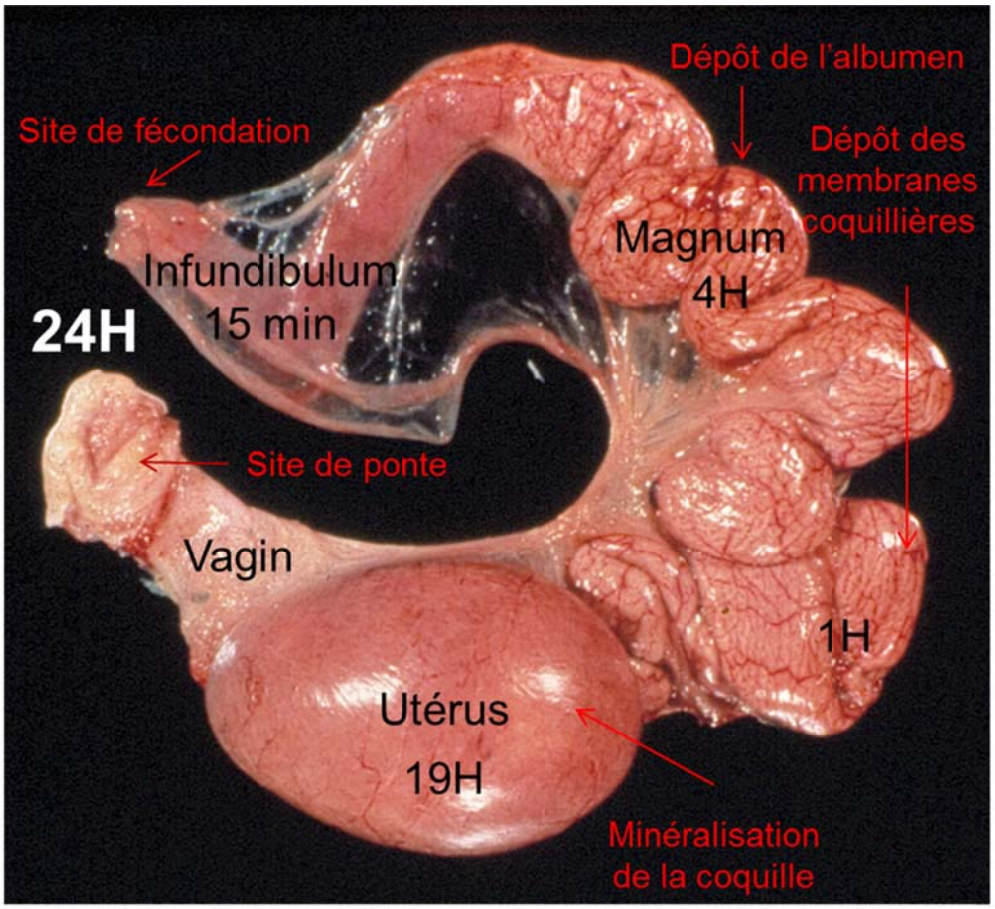


Figure 2. Le tractus génital de la poule avec ces différents compartiments. Le temps de passage de l'œuf dans chaque compartiment du tractus et les fonctions de ces compartiments sont indiqués.

thyroïdiennes. L'ovocyte aviaire en plus du vitellus accumule au cours de la folliculogenèse une grande quantité d'ARNs et de protéines (Davidson 1986) qui doivent assurer l'accomplissement de la méiose, la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire jusqu'à l'activation du génome embryonnaire, ainsi que servir de nutriments tout au long de l'incubation de l'œuf. Ces facteurs dit maternels qui sont stockés dans le disque germinal et dans le jaune (Malewska&Olszanska 1999) influenceraient donc la fertilité. La maturation ovocytaire s'achève par la maturation meïotique et l'ovulation déclenchée par la progestérone sécrétée par les cellules de la granulosa en réponse au pic de la sécrétion de la LH par l'hypophyse. Suite à l'ovulation l'ovocyte migre dans l'infundibulum où il peut être fécondé par les spermatozoïdes. La fécondation chez les oiseaux est polyspermique. Plusieurs spermatozoïdes peuvent pénétrer dans le disque germinal, mais seulement un pronucleus mâle peut fusionner avec le pronucleus de l'oocyte. Chez la poule, après la fécondation l'œuf va passer 24 heures dans le tractus génital femelle avant d'être pondu **(Fig.2).** Tout au long de ce passage dans le tractus le jeune embryon se divise pour atteindre le stade de blastoderme au moment de la ponte parallèlement avec la formation de la couche du blanc et de la coquille. A ce stade, l'embryon compte 30000-50000 cellules. Peu de donnée existait chez la poule concernant les facteurs maternels, leur influence sur la survie du zygote et le développement embryonnaire précoce ainsi que sur l'activation du génome embryonnaire. Parmi les transcrits d'origine maternelle identifiés dans le blastodisque non-fécondé, il y a ceux qui codent pour les protéines anti- et pro-apoptotiques qui jouent probablement un rôle dans la défense du zygote et de l'embryon précoce contre le stress environnemental. Comme chez les différents vertébrés la durée de vie des différents ARNs maternels est très variable et régulée par les mécanismes ciblant les ARNs : dégradation, inhibition de leur traduction, activation spécifique (Bettegowda&Smith 2007). Ces mécanismes permettent l'utilisation des protéines codées par les ARNs maternels puis leur élimination quand leur fonction est terminée ou quand elles peuvent devenir toxiques pour l'embryon (ex. c-mos ((Alizadeh*, et al.* 2005)). La transition entre le contrôle maternel du développement et l'activation du génome embryonnaire a été étudiée chez plusieurs espèces et en particulier chez les amphibiens. Cette transition se fait d'une manière progressive, puisque chez plusieurs espèces l'embryon possède une certaine activité transcriptionnelle avant l'activation majeure du génome embryonnaire. Chez l'oiseau, la dynamique des transcrits maternels au cours de la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire ainsi que le moment exact de l'activation du génome embryonnaire ont été très peu étudiés. En utilisant des inhibiteurs de la synthèse des ARNs avec l'α-amanitin et l'incorporation de ^{32}P-orthophosphate dans les ARNs, il a été montré que la synthèse massive des ARNs débutait à partie du stade XIII (Eyal-Giladi&Kochav 1976; Zagris*, et al.* 1998) Ce stade correspond à quelques heures d'incubation et est lié à l' interaction entre hypoblaste et épiblaste annonçant la formation de la ligne primitive. A ce stade l'embryon du poulet compte plus de 50000 cellules. En comparaison cette reprise de transcription zygotique a lieu au stade blastula chez les amphibiens qui compte 4096 cellules (Nieuwkoop 1956) et avant le stade morula, au stade qui compte quelques

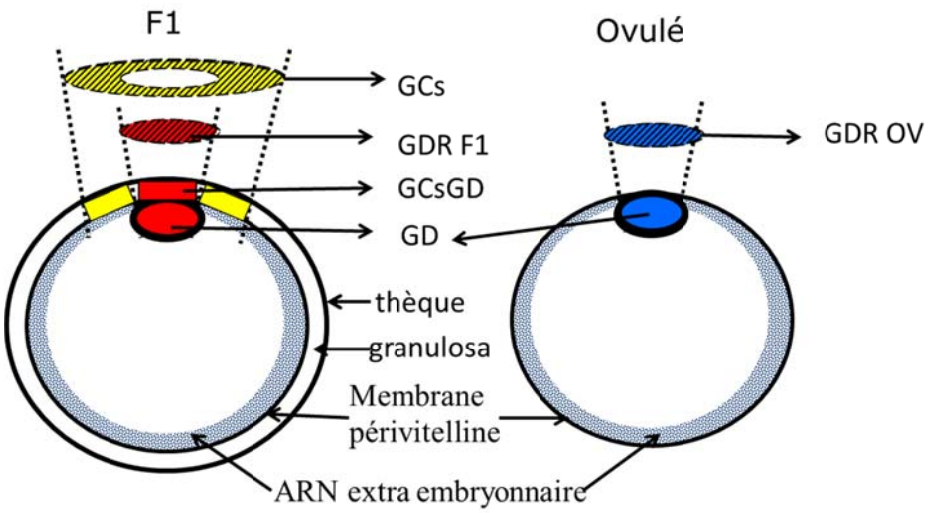


Figure 3. Structure de la région du disque germinal (GDR pour germinal disc région) du follicule F1 (en rouge) et de l'ovocyte ovulé (en bleu) et des zones de cellules de granulosa (GCs pour granulosa cells) (en jaune) en proximité du GDR. Les parties hachurées montrent quelles parties du follicule étaient disséquées pour constituer le pool de GCs, de GDR F1 et de GDR OV (ovulé). GD (pour germinal disc), disque germinale ; GCsGD, cellules de granulosa recouvrant le disque germinal qui ne peuvent pas être dissocié du disque germinale. Trois échantillons GDR F1, GDR OV et GCs ont été utilisés pour l'analyse par microarrays. Chaque échantillon représentait un pool de 25 échantillons individuels, 2 répliquats ont été constitués pour chaque type d'échantillon.

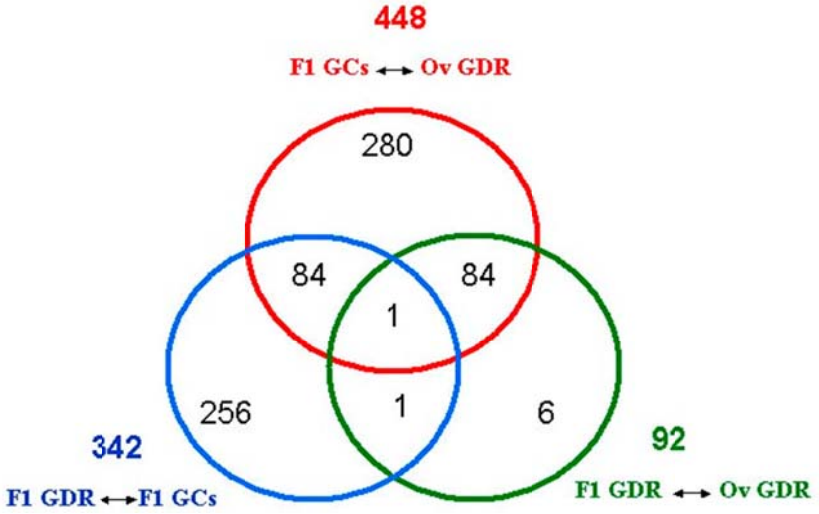


Figure 4. Les relations entre les gènes différentiellement exprimés dans différentes comparaisons. Le diagramme montre le recouvrement des gènes différentiellement exprimés dans différentes comparaisons. Chaque cercle représente le nombre total de gènes différentiellement exprimés dans une comparaison. Les zones de chevauchement représentent des gènes différentiellement exprimés communs pour différentes comparaisons.

cellules chez les mammifères (2 cellules chez la souris, 4-8 cellules chez l'homme). En conséquence les facteurs maternels stockés dans l'ovocyte aviaire doivent non seulement assurer les évènements tels que la maturation méiotique, la fécondation et la différenciation embryonnaire, mais aussi beaucoup de divisions cellulaires. L'importance cruciale des transcrits maternelles pour la survie de l'embryon précoce semble être évidente. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à la dynamique transcriptionnelle durant la maturation ovocytaire, l'ovulation, la fécondation et le développement embryonnaire précoce (48h après fécondation) pour identifier les gènes potentiellement impliqués dans les différentes étapes de ces processus largement méconnus chez l'oiseau avant notre étude.

Gènes Ovocytaires chez la poule (publications **19, 37, 40, 42**).

Pour rechercher les gènes impliqués dans la maturation folliculaire, l'ovulation, la fécondation et le développement embryonnaire nous nous sommes appuyés sur les données disponibles dans les autres espèces concernant les gènes maternels, et nous avons développé en collaboration avec l'unité de Recherche en Génomique Végétale (INRA, Evry) une recherche sans *a priori* des gènes aviaires en utilisant les micorrays Affymetrix, qui représentaient au moment de la réalisation de ce travail l'outil le plus performant pour l'analyse du transcriptome aviaire.

Dans la première approche, nous avons utilisé une liste de gènes ovocytaires murins obtenue par l'analyse différentielle digitale (Dade*, et al.* 2003; Dade*, et al.* 2004; Paillisson*, et al.* 2005). Un travail bioinformatique a permis, grâce à des alignements de séquences de rechercher les gènes aviaires orthologues de gènes murins. Suite à ce travail et à l'étude de leur expression dans l'ovaire de la poule, nous avons gardé 18 gènes de la liste initiale de 101 gènes murins pour une analyse d'expression plus détaillée. Dans la deuxième approche, nous avons comparé les transcriptomes de la région du disque germinal (GDR) des follicules préovulatoires F1, de l'ovocyte ovulé (OV GDR) et les cellules de granulosa des follicules F1 (GCs) (**Fig. 3**) avec un objectif d'identifier de nouveaux gènes spécifiques de l'ovocyte de la poule. L'analyse des données de microarray dans les 3 comparaisons (F1 GDR et OV GDR, F1 GDR et F1GCs et OvGDR et F1GCs) et de la redondance des gènes différentiellement exprimés entre ces comparaisons a montré que relativement peu de gènes (245 gènes) étaient différentiellement exprimés entre les GCs et l'ovocyte (**Fig. 3**) et encore moins entre un ovocyte F1 et un ovocyte ovulé (7 gènes), suggérant que :

1) les profils transcriptionnels des cellules de granulosa et des GDRs des ovocytes F1 et OV diffèrent seulement de 342 et 448 gènes respectivement sur 28000 gènes analysés ;

2) l'ovulation affecte peu le transcriptome du GDR.

Cette approche a également révélé 245 gènes positivement régulés dans l'ovocyte en comparaison avec les GCs, dont 49 étaient communs pour le stade F1 et OV **(Fig. 5)** et par conséquence représentaient les gènes candidats ovocytaires les plus pertinents à explorer pour leurs rôles potentiels dans la maturation ovocytaire, la fertilisation, le développement embryonnaire précoce. Parmi les 238 gènes

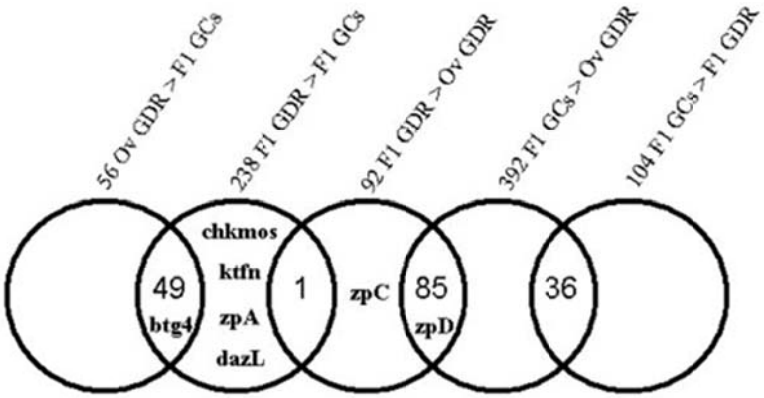


Figure 5. Les relations entre les gènes préférentiellement exprimés dans différentes comparaisons. Le diagramme montre le chevauchement des gènes préférentiellement exprimés dans différentes comparaisons. Chaque cercle représente le nombre total de gènes préférentiellement exprimés dans une comparaison. Les zones de chevauchement représentent gènes préférentiellement exprimés &communs pour différentes comparaisons surexprimés. Les gènes identifiés par l'approche in silico et trouvés. préférentiellement exprimés dans différentes comparaisons sur les microarrays sont indiqués.

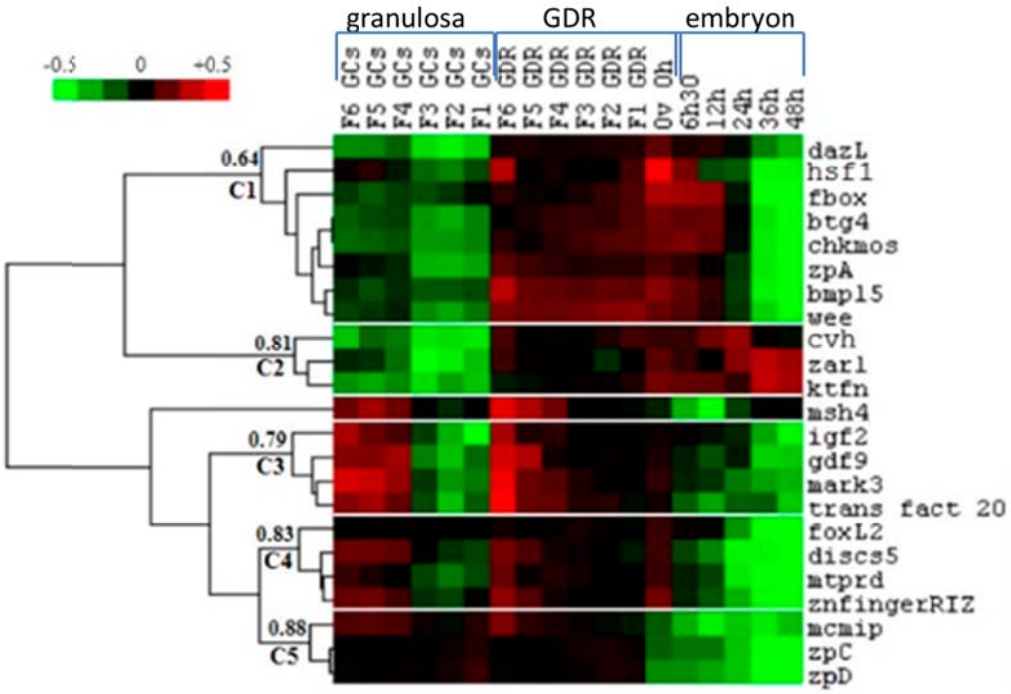


Figure 6. Classification hiérarchique Supervisé de 23 gènes candidats au cours de la maturation folliculaire et le développement précoce de l'embryon, analysé par par PCR en temps réel en dupliquats techniques et biologiques. F6-F1, follicules hiérarchiques de différentes taille (F6 - le plus petits, F1 – le plus grand, préovulatoire). GCs, cellules de granulosa ; GDR, région du disque germinales ; Ov, GDR du follicule ovulé ; 6 h30, 12 h, 24 h, 36 h et 48 h, l'embryon précoce à différent temps après l'ovulation. Classification hiérarchique supervisée de gènes a été réalisée en utilisant le logiciel Cluster 3. Cinq groupes sont représentés (C1 à C5). Seuils de corrélation sont indiqués pour chaque groupe.

préférentiellement exprimés dans F1 GDR en comparaison avec les GCs nous avons trouvé 5 gènes (*chkmos*, *ktfn*, *zpA*, *dazL*, *btg4*) également identifiés comme gènes candidats ovocytaires de la poule dans l'approche *in silico* **(Fig. 5)**. Un de ces gènes btg4 est aussi préférentiellement exprimé dans OV GDR en comparaison avec GCs. Un autre gène zpC, préférentiellement exprimé dans F1 GDR en comparaison avec OV GDR a été également présent dans notre liste de gènes-candidats. Ce résultat suggère que les deux approches utilisées (*in silico* et microarray) sont fonctionnelles et complémentaires dans la recherche des gènes ovocytaires. L'annotation des gènes différentiellement exprimés entres GCs et GD (pour germinal disque) par Gene Ontology (GO) a révélé que les gènes positivement régulés dans les GCs étaient essentiellement liés au métabolisme, au transport, à la protéolyse et à la régulation de la transcription, l'adhésion cellulaire et la réponse immunitaire, tandis que les gènes préférentiellement exprimés dans le GD étaient préférentiellement impliqués dans le cycle cellulaire, l'organisation des chromosomes, la phosphorylation des protéines, la régulation de la transcription et le développement de l'organisme multicellulaire, ce qui est cohérant avec la fonction des GCs et GDR respectivement. L'analyse plus détaillée de la dynamique spatio-temporelle d'expression de 23 gènes sélectionnés issus de l'approche *in silico* et de l'analyse des données des microarrays par PCR en temps réel durant la folliculogenèse et le développement embryonnaire précoce a permis de mettre des hypothèses sur les rôles potentiels de ces gènes. Effectivement ces gènes ont montré des profils d'expression spécifiques au stade de la folliculogenèse ou du développement de l'embryon jusqu'à l'activation de son génome, et au type cellulaire (GCs ou GDR). Grâce à la classification hiérarchique des données de leur expression ils ont été regroupés dans 5 clusters ce qui a permis d'établir pour la première fois un aperçu au niveau moléculaire de l'évolution du follicule hiérarchique jusqu' à l'ovulation, la fécondation et le développement du zygote (**Fig. 6**). L'expression de la majorité des gènes étudiés déclinait entre l'ovulation et l'ovoposition qui précède l'activation du génome embryonnaire, ce qui confirme que l'arrêt de l'activité transcriptionnelle et la dégradation progressive des transcrits maternels décrit chez les autres espèces a également lieu chez le poulet. Cependant, chez le poulet la dégradation de l'ARN ribosomal semble être beaucoup plus marquée que celle de l'ARN maternel, comme l'a montré l'analyse globale de la qualité de l'ARN total et de la transcription inverse en présence du ^{32}P. Effectivement, à partir du stade Ov et jusqu'à 24h après l'ovulation (avant l'activation du génome), le pic correspondant à l'ARN 28S devient presque invisible et le pic 18S est très dégradé (**Fig 7**). Ces pics sont complétement restaurés 36h après l'ovulation, et donc après l'activation du génome embryonnaire. En revanche l'ARNm ne semble pas être touché au moins au stade OV. Dans ce sens l'expression de cinq gènes du cluster 1 *chmos*, *btg4*, *wee*, *dazl* et *zpA* augmentait durant les étapes finales de la maturation folliculaire et leur expression était maintenue jusqu'à 24 h après l'ovulation, mais disparaissait complétement à partir de 36h après l'ovulation donc après l'activation du génome embryonnaire, suggérant l'origine maternelle de ces transcrits. L'expression spécifique de l'ovocyte a été confirmée pour *chmos*, *btg4*, *dazl* et *zpA*. Chez les

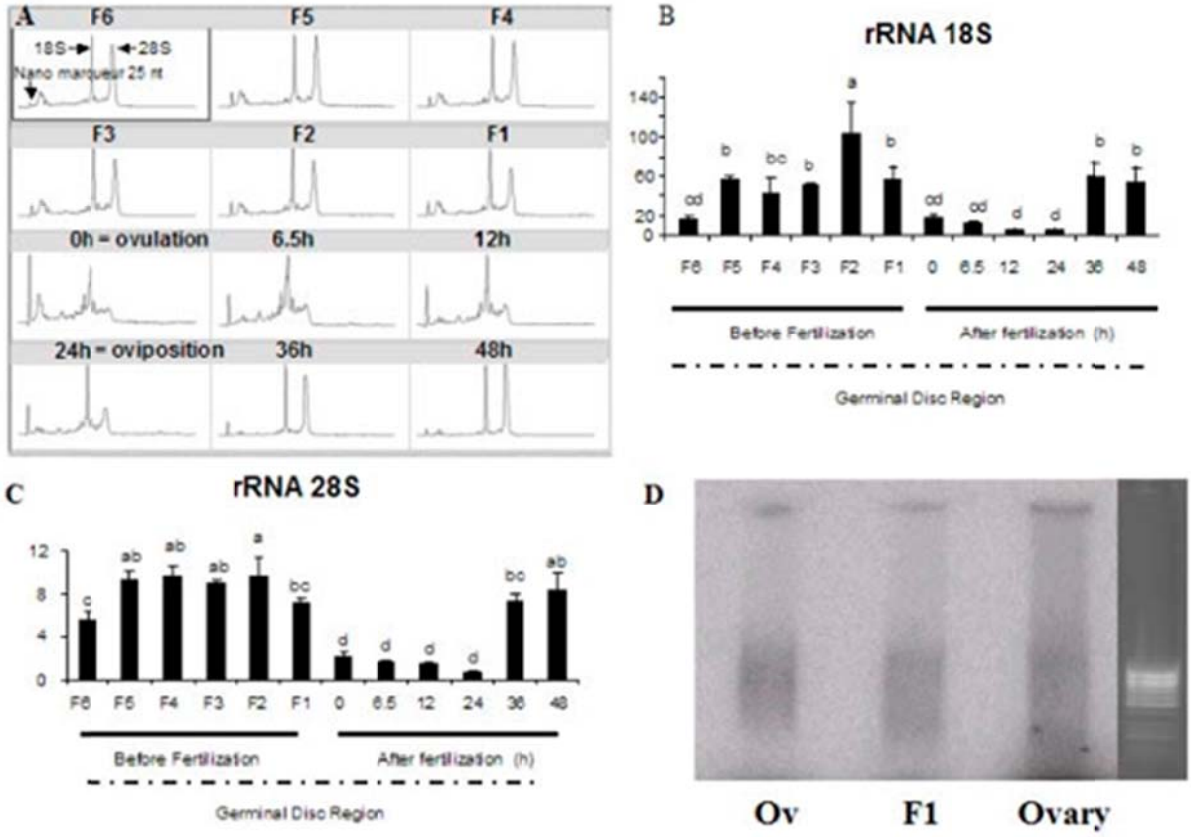


Figure 7. L'ARN total a été extrait du GDR (région du disque germinale) de l'ovocyte ou de l'embryon. L'évolution des profils d'ARNr 18S et 28S à dans les échantillons d'ARN totale des GDR au cours de la maturation folliculaire et le développement embryonnaire précoce évalués à l'aide des nanopuces (Agilent technologies) (**A**). Les profils d'ARN des sous-unités ribosomiques 18S et 28S évalués par PCR en temps réel (**B** et **C**, respectivement) en utilisant le kit TaqMan (Eurogentec). La transcription inverse en présence de ^{32}P a été réalisée pour l'ARNm extrait de F1 GDR, Ov GDR (voir **Fig.3**) et de l'ovaire. Le signal radioactif pour les échantillons et coloration au bromure d'éthidium pour le marqueur de taille (**D**). GCs, cellules de granulosa ; GDR, région du disque germinales ; Ov, GDR du follicule ovulé ; 6 h30, 12 h, 24 h, 36 h et 48 h, l'embryon précoce à différent temps après l'ovulation. Sur les figures **B** et **C** les lettres différentes représentent les différences d'expression significatives.

autres espèces, *Chmos*, *btg4* et *wee* sont connus pour être impliqués dans le cycle cellulaire et peuvent être utilisés durant les dernières étapes de la maturation ovocytaire et le développement du zygote. *Chmos* est un homologue du gène *mos* (Schmidt*, et al.* 1988), protéine-kinase nécessaire pour la maturation méiotique chez les vertébrés où il régule l'activité de M-phase promoting factor (MPF) (Haccard&Jessus 2006; Inoue*, et al.* 2007) et pour l'arrêt mitotique des ovocytes des vertébré (Inoue *et al.* 2007). Btg4 (B cell translocation gene 4) appartient à la famille des inhibiteurs du cycle cellulaire. C'est un gène préférentiellement ovocytaire chez la souris et chez le bovin (Buanne*, et al.* 2000; Pennetier*, et al.* 2006) ou il exerce une activité antiproliférative (Vallee*, et al.* 2005). Wee, un gène conservé des invertébrés aux mammifères, est connu pour réguler la maturation méiotique de l'ovocyte (Schmidt *et al.* 1988) (Inoue *et al.* 2007; Yue&Ferrell 2006). Le gène *dazl* est également un transcrit d'origine maternelle chez le medaka, où chez l'adulte il est détecté exclusivement dans l'ovaire et le testicule (Xu*, et al.* 2007). Un autre gène du cluster 1 très préférentiellement exprimé dans l'ovocyte, bmp15, a également un rôle dans la maturation folliculaire. Son action inhibitrice similaire à celle rapportée pour les mammifères sur la synthèse et la sécrétion de la progestérone en particulier induite par les gonadotropines par les cellules de granulosa (McNatty*, et al.* 2005; Otsuka*, et al.* 2000; Su*, et al.* 2004) a été démontrée (publication **18**). Les gènes zpA, zpC and zpD appartenant à la famille des protéines de la zone pellucide sont connus pour être impliqués dans l'ovogénèse, la fécondation et le développement préimplantatoire (Wassarman*, et al.* 2004). Chez le poulet comme nous avons pu démontrer par PCR en temps réel et hybridation in situ, que *zpA*, à la différence des gènes *zpC* et *zpD* exprimés dans l'ovocyte et dans les cellules somatiques, est exprimé uniquement dans l'ovocyte comme chez la souris. D'ailleurs ces trois gènes étaient distribués dans des clusters différents (**Fig 6**). Il est intéressant de noter que le gène ZpD n'existe pas chez la souris et a été identifié par l'approche « microarray » comme un gène préférentiellement exprimé dans les cellules de granulosa. D'autre gènes comme *zar1*, *cvh*, *ktfn* du cluster 2 étaient également préférentiellement exprimés dans le GDR, mais à la différence des gènes du cluster 1, leur expression était maintenue dans l'embryon d'une manière continue et augmentait significativement de 24h à 36h après l'ovulation, ce qui suggère leur implication non seulement dans la maturation ovocytaire, mais aussi dans le développement embryonnaire. Contrairement à *ktfn*, qui n'a jamais été étudié dans le contexte de la reproduction, zar1 a été étudié auparavant pour son rôle dans la maturation ovocytaire et le développement du zygote. C'est un des rares gènes spécifiques de l'ovocyte avec un effet maternel confirmé. Il est essentiel pour la transition ovocyte-embryon chez la souris et supposé être impliqué dans l'initiation du développement embryonnaire et contrôle de la fertilité. (Uzbekova*, et al.* 2006; Wu*, et al.* 2003). Nos données suggèrent son rôle conservé chez le poulet. D'autres gènes de notre liste avec l'expression préférentiellement ovarienne sont également exprimés dans les GCs et dans le GDR (Clusters 3et 4) et leur expression respective diminuait durant la maturation folliculaire et persistait à de faibles niveaux dans le jeune embryon, ce qui laisse penser qu'ils sont particulièrement impliqués dans les premiers stades de la maturation folliculaire.

En conclusion, cette étude a permis de générer une liste de 460 gènes exprimés dans la granulosa et 250 gènes exprimés dans l'ovocyte. L'approche microarray a permis de générer une liste de gènes potentiellement de l'ovocyte mature et une liste des gènes des cellules de granulosa du follicule mature. Il est intéressant de noter que 40% de ces gènes n'avaient pas d'homologues dans les bases de données et donc peuvent correspondre aux mécanismes spécifiques aviaires tels que la maturation folliculaire hiérarchique ou encore l'accumulation rapide du vitellus. Ainsi, nous avons pu confirmer l'expression spécifique ovocytaire pour 8 gènes : BTG4, CHKMOS, WEE, ZPA, DAZL, CVH, ZAR1 et KTFN. La classification hiérarchique des données de PCR en temps réel a permis d'établir des groupes de gènes impliqués dans la maturation folliculaire, la maturation méiotique, la fécondation, le développement embryonnaire précoce, le développement après l'activation du génome embryonnaire. Cependant d'autres gènes également trouvés surexprimés dans l'ovocyte dont une grande partie sont nouveaux et n'ont pas d'homologues dans les banques de données, restent à explorer. Par ailleurs nous avons trouvé que le profil global de l'ARN ribosomal était modifié dans le disque germinal entre l'ovulation et l'activation du génome embryonnaire dans le sens de sa dégradation, phénomène qui n'avait pas été décrit auparavant. Cette dernière découverte pose des questions sur l'état et le rôle de la machinerie de la transcription et de la traduction dans le jeune embryon avant l'activation de son propre génome.

Les gènes ovocytaires et la fertilité chez la poule (publication 20). Dans un deuxième temps nous avons recherché si les poules ayant une bonne ou une mauvaise fertilité exprimaient des différences d'expression du génome au niveau transcriptonnel au cours de la maturation ovocytaire et du développement embryonnaire précoce, avec l'objectif d'identifier des marqueurs potentiels de la fertilité chez la poule, qui pourraient être inclus dans les schémas de sélection, puisque celle-ci peut avoir un impact sur le succès de la reproduction chez les animaux d'élevage. En effet, les porcs sélectionnés sur la croissance rapide présentent une détérioration des paramètres de reproduction (Robinson&Buhr 2005). Une tendance similaire a été observée chez les espèces avicoles (Barbato 1999; Brake 1998; Clayton 1972; Reddish*, et al.* 2003; Ye*, et al.* 1999). L'étude de la variation de l'expression des gènes de l'ovocyte entre les animaux présentant des différences de fertilité est une voie pour explorer ce problème. Ainsi chez la truite-arc-en-ciel les niveaux d'expression de plusieurs transcrits sont diminués dans les œufs de mauvaise qualité (Aegerter*, et al.* 2005). En raison de plusieurs de ses spécifiés, en particuliers une hiérarchie folliculaire strict (Etches&Petitte 1990) et une activation du génome embryonnaire tardive (Zagris *et al.* 1998), la poule est un modèle original pour étudier ce phénomène. Les variations de l'expression des transcrits dans l'ovocyte mature peuvent être une des explications des différences de fertilité et peuvent servir au développement des marqueurs de la qualité ovocytaire.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons choisi l'approche transcriptomique à haut débit en utilisant les puces pangénomiques Affymetrix et comme modèle deux couples de lignées divergentes sélectionnées soit sur le critère " vitesse de croissance" (lignées type chair X33 (à croissance rapide)/X44

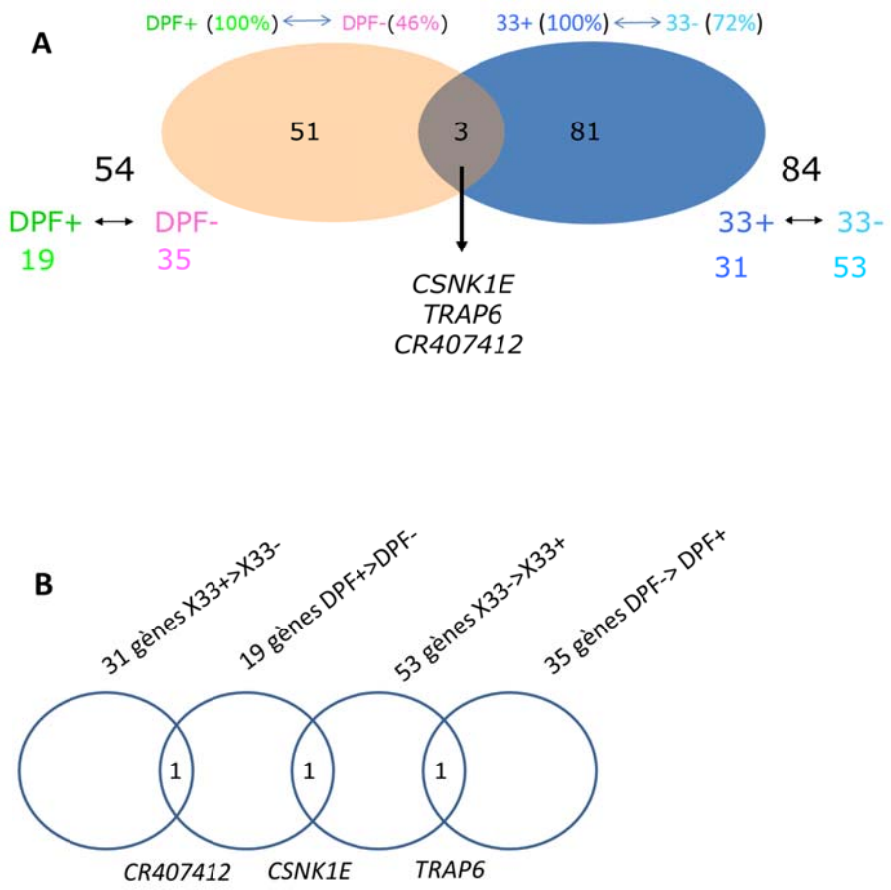


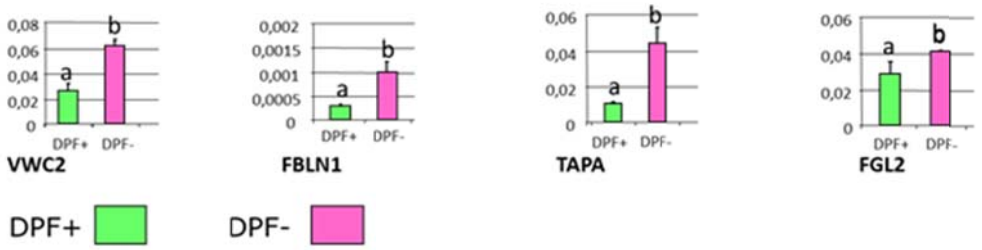
Figure 8. Diagrammes représentant la redondance entre les gènes différentiellement exprimés dans les différentes comparaisons. **A.** Comparaison des gènes différentiellement exprimé gènes entre les entre les animaux des lignées DPF+ et DPF- et les animaux plus fertiles et moins fertiles de la lignée X33 à croissance apide (33+ et .33-). La moyenne de fertilité est indiquée en pourcentage pour les animaux de chaque lignée ou de groupe qui ont participé dans l'expérience. Chaque cercle représente le nombre total de gènes différentiellement exprimés dans une comparaison donnée. La zone de chevauchement représente les gènes différentiellement exprimés communs pour les deux comparaisons. **B.** Le diagramme montre la redondance des gènes préférentiellement exprimés entre les différentes comparaisons. Chaque cercle représente le nombre total des gènes surexprimés dans une comparaison. La zone de chevauchement représente des gènes surexprimés communs dans de différentes comparaisons. Le nom de ces gènes est indiqué.

(à croissance lente) soit sur le critère « durée de période fertile » (lignées de poules pondeuses DPF+ et DPF-) et en comparant des ovocytes et des embryons des groupes de poules avec une bonne ou une mauvaise fertilité. Effectivement les deux couples de lignées avec les origines différentes présentaient régulièrement des problèmes de fertilité. Concernant les lignées X33/X44 l'étude de fertilité ne nous a pas permis d'identifier les différences entre les deux lignées, en revanche nous avons pu sélectionner à l'intérieur de chaque lignée les individus avec une bonne et une mauvaise fertilité. Concernant les lignées DPF+ et DPF- les différences de fertilité étaient clairement exprimées entre les lignées : les DPF+ (duré de la période fertile longue) avaient une bonne fertilité tandis que les DPF- avaient une fertilité détériorée. L'utilisation de deux modèles génétiques complétement différents devait nous permettre de répondre à une autre question importante pour la recherche des marqueurs de qualité: « Est-ce que les mêmes gènes ou des gènes différents sont affectés selon le génotype sélectionné ». Autrement dit est-ce qu'il est possible d'identifier un ou des marqueurs commun(s) de qualité. Avec ces objectifs nous avons comparé des transcriptomes de la région du disque germinal (GDR) qui est structurellement et fonctionnellement analogue à l'ovocyte des mammifères, les plus grands follicules F1 des poules avec une bonne et mauvaise fertilité à l'intérieur de la lignée X33 (à croissance rapide) et entre les lignées DPF+ et DPF-. L'écart de fertilité moyenne entre les animaux fertiles et moins fertiles sélectionnés pour l'analyse était beaucoup plus modérés (28%) pour les individus X33+ (fertiles) et X33-(moins fertiles) en comparaison des individus DPF+(fertiles) et DPF-(moins fertiles), qui était de 54%. Cette analyse nous a permis de constater que les différences de fertilité étaient accompagnées par une relativement faible variation des transcriptomes. Seulement 54 et 84 gènes sur 28000 gènes analysés étaient différentiellement exprimés entre les poules DPF+ et DPF- et X33+ et X33- respectivement (**Fig 8 A**). Le différentiel d'expression modéré (entre 0,7 et 8) reflétait les différences modérées de fertilité. Seulement 3 gènes parmi l'ensemble des gènes différentiellement exprimés étaient communs pour les deux comparaisons (*TRAP6*, *CR407412* et *CSNK1E*) (**Fig. 8B**), suggérant que les différences de fertilité dues à la variabilité individuelle à l'intérieur de la lignée chair à croissance rapide d'un côté et à la sélection divergente sur la durée de la période fertile d'un autre coté fait intervenir les mécanismes différents. Ce résultat a répondu à une de nos questions sur la possibilité de trouver les marqueurs robustes de fertilité communs aux différentes lignées. Il est évident que les marqueurs doivent être rigoureusement vérifiés dans chaque nouveau contexte de détérioration de fertilité. Un autre résultat intéressant de cette étude est que la fonction prédominante déterminée par GO (pour les poules X33) ou bien représentée (pour les DPF) était l'immunité. L'étude des cinétiques d'expression durant la maturation folliculaire et le développement embryonnaire précoce de 10 gènes sélectionnées comme les plus différentiellement exprimés (sur les disques germinaux individuels issus des poules avec une fertilité différente à l'intérieur des lignées X33et X44 et entre les lignées DPF+/DPF-) a permis d'identifier six gènes dont l'expression corrélait avec la fertilité. Exemple de validation de quelques gènes est présenté sur la **Fig. 9**. En se basant sur l'ensemble des différentes analyses entreprises pour valider et mieux comprendre les données transcriptomiques obtenues, nous avons pu identifier parmi les gènes différentiellement exprimés

A

Abbréviation des gènes étudiés	Différentiel d'expression	Comparaison	Fertilité moyenne
VWC2	5.2	DPF-DPF+	46%/100
FBLN1	4.9		
TAPA	4.8		
FGL2	4.6		

B



C

corrélation DPF+/-	*tapa*	*vwc2*	*fgl2*
F1	-0.659	-0.541	-0.68

Figure 9. Exemple de validation de 4 gènes différentiellement exprimés dans l'analyse par microarrays (**A**) par PCR en temps réel (**B**) et de 3 de ces gènes par l'étude de corrélation entre la fertilité et le niveaux d'expression génique en utilisant les individus de fertilité différente (**C**). L'expression F1, GDR du follicule F1. L'expression des gènes était normalisée par 3 gènes de référence βActin, GAPDH et EF1A.

.

sur les microarrays cinq gènes dont l'expression dans le GDR corrélait à la fertilité : (*VWC2*, *CR407412, TAPA, FGL2 et TRAP6*). Ces gènes peuvent être considérés comme marqueurs candidats forts de la qualité de l'ovocyte. Parmi ces gènes, deux gènes *TRAP6, TAPA* sont directement liés à l'immunité, tandis que deux autres *VWC2* et *FGL2* sont impliqués dans la signalisation par les voies des BMPs, dans l'embryogénèse et l'homéostasie respectivement. *TRAP6* a également été identifié comme gène ovocytaire dans cette étude ce qui renforce encore plus l'implication potentielle de ce gène dans les problèmes de fertilité. Il est particulièrement intéressant que l'expression d'un régulateur d'inflammation soit affectée dans le cas d'altération de fertilité dans les deux lignées ponte et chair, l'inflammation etant une composante essentielle du processus d'ovulation (Kalantaridou*, et al.* 2007). Parmi ces 5 gènes seulement *FGL2* avait été montré comme étant impliqué dans la reproduction auparavant (succès ou interruption de la gestation chez la souris et la femme) (Clark*, et al.* 1999). *CR407412* n'a pas été décrit dans la littérature et représente un nouveau gène potentiellement lié à la fertilité.

En conclusion, ce travail présente une première étude de corrélation entre l'expression des gènes dans le disque germinal de l'ovocyte aviaire et la fertilité. Malgré beaucoup de difficultés bio-techniques (collecte du matériel biologique chez les poules avec la fertilité détériorée, différences relativement faibles de fertilité pour espérer avoir de fortes différences d'expression génique, grande variabilité individuelle d'expression génique), ce travail a permis pour la première fois d'apporter une vision cohérente de l'altération de l'expression génique en lien avec la fertilité chez la poule dans différents contextes génétiques. Notre étude également suggère l'implication de l'immunité dans les problèmes de fertilité et ceci indépendamment des contextes génétiques étudiés. Finalement elle a fourni des marqueurs potentiels de la fertilité qui pourraient être inclus dans les schémas de sélection.

Perspectives des travaux réalisés sur l'identification des gènes impliqués dans la compétence ovocytaire et le développement embryonnaire précoce et des gènes corrélé à la fertilité.

Suite à la réorientation de notre équipe selon de la politique de l'UMR vers des thématiques portant sur le développement testiculaire et la création de l'équipe « Testicule, Ontogénèse métabolisme » en 2010, la décision d'arrêter la recherche sur le développement ovarien était prise et les travaux synthétisés ci-dessus sur ce sujet n'ont pas été poursuivis. Cependant ce travail a produit beaucoup de données et ouvre des perspectives larges. Pour ces raisons, je présente les perspectives de ce travail dans ce chapitre séparément des perspectives liées à mon projet de recherche actuel présenté à la fin du manuscrit.

Pour la première fois, l'évolution de l'expression génique au niveau transcriptionnel au cours de la maturation folliculaire et du développement embryonnaire précoce chez le poulet a été mise en évidence et un lien entre l'expression des gènes au cours de ces processus et la fertilité a été révélée. Ainsi, le transcriptome des GDRs a été analysé en utilisant les microarrays Affymetrix avec les sondes correspondant aux 28000 gènes ce qui a permis d'identifier de nombreux gènes comme potentiellement impliqués dans les différentes étapes de la maturation folliculaires aux niveaux de l'ovocyte et des

cellules de granulosa ou au cours du développement du zygote. Parmi les gènes identifiés beaucoup sont nouveaux et n'ont pas d'homologues dans les banques de données. En particulier nous avons pu mettre en évidence les transcrits d'origine maternelle dont l'importance pour la survie du zygote et le développement embryonnaire précoce était démontré chez les autres espèces. Différentes approches pourraient être envisagées pour étudier la fonction des gènes en question. Une de ces approches consisterait à utiliser les modèles d'ovulation et de fécondation in vitro de l'ovocyte de la poule qui ont été développés dans notre équipe (Batellier*, et al.* 2003) pour étudier la fonction des gènes d'intérêt par l'injection des ARNs d'interférence, l'électrolocation des morpholinos des gènes d'intérêt dans le disque germinal. Développer l'hybridation in situ sur les différents stades du développement embryonnaire nous permettrait de localiser les transcrits au niveau des blastomères et de mieux comprendre leur fonction. Comme déjà mentionné, le poulet est un excellent modèle pour étudier la folliculogenèse et le développement embryonnaire avant l'activation du génome grâce à i) la hiérarchie folliculaire strict, ii) le délai très important entre la fécondation et l'activation du génome (>24h), iii), le nombre important de cellules (30000-50000) au moment de l'activation du génome. Ces particularités permettent de mieux explorer les différents stades et de suivre la cinétique de disparition et d'apparition des transcrits. Dans notre étude, nous avons trouvé une évolution différente de l'ARN ribosomal et de l'ARN maternel. A la différence de l'ARN maternel qui restait intact, une forte dégradation de l'ARN ribosomal a été observée entre l'ovulation et l'activation du génome embryonnaire ce qui suggère l'arrêt ou une forte diminution de la traduction pendant cette période. Il serait intéressant de rechercher si la machinerie traductionnelle s'arrête complétement durant cette période ou si la traduction de certaines protéines spécifiques, comme par exemple CVH, continue (Tsunekawa*, et al.* 2000). Nous avons étudié une composante unique de l'expression du génome dans l'ovocyte et le jeune embryon : le transcriptome. Une approche protéomique permettrait de mieux comprendre quelles protéines sont stockées et comment elles sont utilisées durant le développement embryonnaire. Une comparaison de l'évolution du protéome et du transcriptome présenterait un intérêt particulier pour avoir une image plus complète des évènements moléculaires au cours de ces processus. Une autre approche serait une étude phylogénétique des gènes identifiés dans notre étude. L'étude intégrant la recherche sur le degré de conservation de la structure de ces gènes et de leur environnement génique, la comparaison de leurs profils expressionnels chez les vertébrés ainsi que la morphologie des organes où ces gènes exercent leurs fonctions chez les différentes classes de vertébrés permettrait de tester des hypothèses fortes sur la conservation de leur fonction et leur intérêt dans la fonction étudiée.

Notre travail sur les gènes liés à la fertilité ouvre également de nombreuses perspectives dont la première est l'étude de l'implication de l'immunité dans la maturation ovocytaire, l'ovulation et le développement embryonnaire précoce, domaine qui n'est pas du tout exploré chez la poule et pas suffisamment exploré chez les autres espèces. Des acteurs moléculaires impliqués dans les réseaux moléculaires des 5 gènes candidats identifiés durant ces processus ainsi que dans le cas des animaux fertiles et moins fertiles pourraient être identifiés en première approche. Du point de vue appliqué ces

gènes représentent des marqueurs potentiels de fertilité et leur expression devrait être analysée dans d'autre cas d'altération de fertilité par exemples les lignées commerciales grandes-parentales.

En conclusion cette étude ouvre beaucoup de voies d'exploration aussi bien pour générer des connaissances fondamentales tant sur la régulation au niveau moléculaire de la maturation folliculaire, l'ovulation, fécondation et le développement embryonnaire précoce que sur le plan finalisé du développement des marqueurs de fertilité.

2.3B Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation gonadique chez le poulet.

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des gonades chez le poulet est un autre pôle de recherche que j'ai développé au sein de mon équipe à l'URA, puis à l'UMR PRC de l'INRA de Tours en collaboration essentiellement avec l'équipe « Différenciation et déterminisme du sexe » de l'INRA de Jouy-en-Josas et S. Fabre (UMR PRC). J'ai développé cette thématique en se basant sur mon expérience antérieure que j'ai acquise en travaillant sur la différenciation du sexe chez les poissons et qui m'a permis de mieux appréhender l'aspect comparé de ma recherche. Les particularités de la différenciation gonadique des oiseaux présentent un intérêt aussi bien en recherche fondamentale que finalisée. Une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans ce processus permettrait de décrire des mécanismes conservés chez les vertébrés et ceux spécifiques des oiseaux. Elle devrait contribuer à terme à une meilleure maîtrise des sex-ratios dans les élevages spécifiques et au développement de nouvelles biotechnologies de conservation des patrimoines génétique aviaires, présentés dans la partie « projet de recherche » ; ces deux aspects constituent des véritables enjeux de l'aviculture moderne.

Les particularités de la différenciation et du développement gonadique chez l'oiseau

Parmi les particularités propres aux oiseaux par rapport aux mammifères, on citera l'hétérogamétie de la femelle, l'asymétrie de son appareil génital ainsi que la relative plasticité de la différenciation gonadique envers les stéroïdes. Cette dernière est intermédiaire entre, d'un côté les poissons et les reptiles chez lesquels les inversions de sexe phénotypique causées par les facteurs environnementaux et/ou hormonaux peuvent être complètement fonctionnelles, et d'un autre côté les mammifères chez lesquels la différenciation gonadique est strictement verrouillée par le contrôle génétique. Chez les oiseaux « modernes » (ex : Gallus gallus) comme chez les mammifères et à la différence des poissons, les chromosomes sexuels sont bien différenciés. SRY qui est un gène du déterminisme du sexe chez l'homme et chez les mammifères, n'a pas été trouvé chez l'oiseau. L'étude fonctionnelle du gène DMRT1 localisé sur le chromosome Z chez le poulet l'a positionné comme un

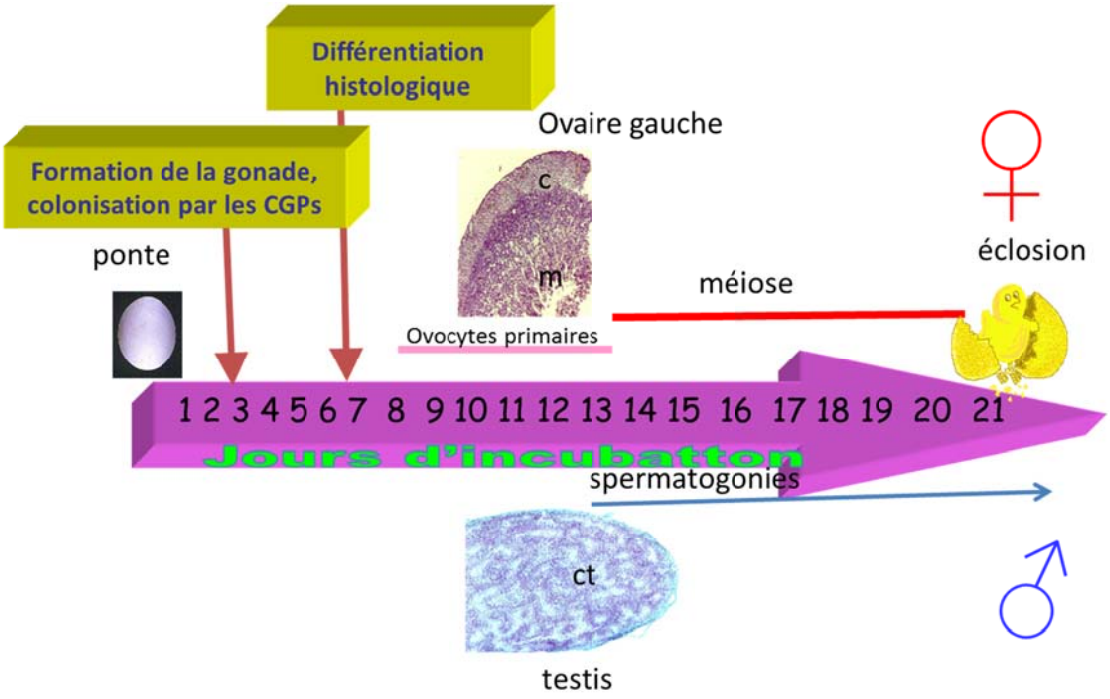


Figure10. Les étapes de la différentiation et du développement gonadique chez le poulet. c, cortex ; m, medula ; cordons testiculaires. Les ébauches gonadique se forme vers jour 2,5 d'incubation (stade 12-14 HH) et colonisées rapidement par les cellules germinales primordiales (CGPs) qui migrent de l'aorte dorsale dans les crêtes génitales (stade 14-17 HH). A 6,5 d'incubation jours les premiers signes de la différenciation histologique apparaissent : développement du cortex chez la femelle dans la gonade gauche et de la medula lacunaire et des cordons testiculaires chez le mâle. Vers 8 jours d'incubation les CGPs femelle se différencient en ovocytes primaires dans l'ovaire gauche. Vers 13 jours d'incubation les CGPs femelles de l'ovaire gauche entament la première division méiotique d'une manière asynchrone et vers l'éclosion elles sont bloquées dans la diplotène de la prophase de la première division méiotique. Chez le mâle les CGPs se différencie en spermatogonies vers 13 jours d'incubation et entre en phase de repos pour reprendre les divisions mitotiques vers 10 semaines après l'éclosion.

candidat fort du déterminisme du sexe (Smith*, et al.* 2009). Cependant, l'implication des gènes du chromosome W dans le déterminisme du sexe chez le poulet reste une hypothèse de travail. D'une manière similaire aux poissons et aux reptiles et à l'opposé de la souris, les stéroïdes jouent un rôle majeur dans la différenciation gonadique des oiseaux. Une cascade moléculaire encore inconnue à ce jour permet dans les embryons ZW (femelle) l'activation de l'enzyme aromatase, qui assure la production des estrogènes indispensables à la différenciation ovarienne (Scheib 1983). L'injection des inhibiteurs d'aromatase dans l'œuf avant la différenciation sexuelle des gonades induit l'inversion phénotypique du sexe des femelles génétiques avec le développement des testicules produisant des spermatozoïdes, mais qui ne sont pas fécondants (Elbrecht&Smith 1992; Vaillant*, et al.* 2003). L'injection des estrogènes dans l'œuf au même stade induit une féminisation transitoire des mâles génétiques (Scheib 1983). Récemment il a été démontré à l'aide d'un vecteur rétroviral que l'expression de l'aromatase dans les gonades des embryons mâles était suffisante pour réprimer le programme génétique mâle et activer la voie femelle et la féminisation de la gonade ZZ. Cependant seulement les zones de la gonade mâle exprimant Cyp19A1 étaient féminisées indiquant l'action locale des estrogènes synthétisés (Lambeth*, et al.* 2013). Les estrogènes sont à leur tour des activateurs de nombreux gènes assurant le développement ovarien ou inhibiteurs des gènes de la différenciation testiculaire. En absence du chromosome W dans les embryons ZZ (mâle), la cascade moléculaire du déterminisme du sexe qui est encore largement méconnue mais qui implique le gène DMRT1 (Smith *et al.* 2009) déclenche l'expression de Sox9 et régule positivement l'expression de l'AMH, gènes majeurs bien conservés de la différenciation testiculaire. La régulation positive de l'expression de ces deux gènes concorde avec le début de la différenciation histologique du testicule. Dans ce cas, le gène CYP19A1 codant pour l'aromatase reste complètement éteint. Les gènes impliqués dans les cascades moléculaires de la différenciation gonadique sont d'une manière générale bien conservés chez les vertébrés, mais leurs cinétiques d'expression et leurs rôles peuvent être très différents. L'expression d'une vingtaine d'orthologues des gènes mammaliens a été étudiée durant la différenciation chez le poulet avant notre recherche, cependant les mécanismes moléculaires de cette dernière restaient et restent largement méconnus. De plus, les profils d'expression de ces orthologues dans plusieurs cas sont différents de ceux des mammifères comme par exemple c'est le cas pour les gènes SOX9 et AMH (Oreal*, et al.* 1998).

Dans ce contexte l'objectif de mon travail a visé l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la différenciation gonadique chez le poulet et l'étude de leurs profils d'expression et leur fonction pour enrichir notre connaissance du contrôle du sexe.

Identification des gènes potentiellement impliqués dans la différenciation gonadique chez le poulet.

FOXL2 est un gène majeure de la différenciation ovarienne chez le poulet (publication 16).

Dans un premier temps, je me suis intéressée au gène FOXL2 dont le rôle majeur dans la différenciation ovarienne chez la chèvre a été découvert par E. Pailhoux et al. (Équipe « Déterminisme et différenciation gonadique » de Jouy-en-Josas) (Pailhoux*, et al.* 2001). FOXL2 appartient à la famille

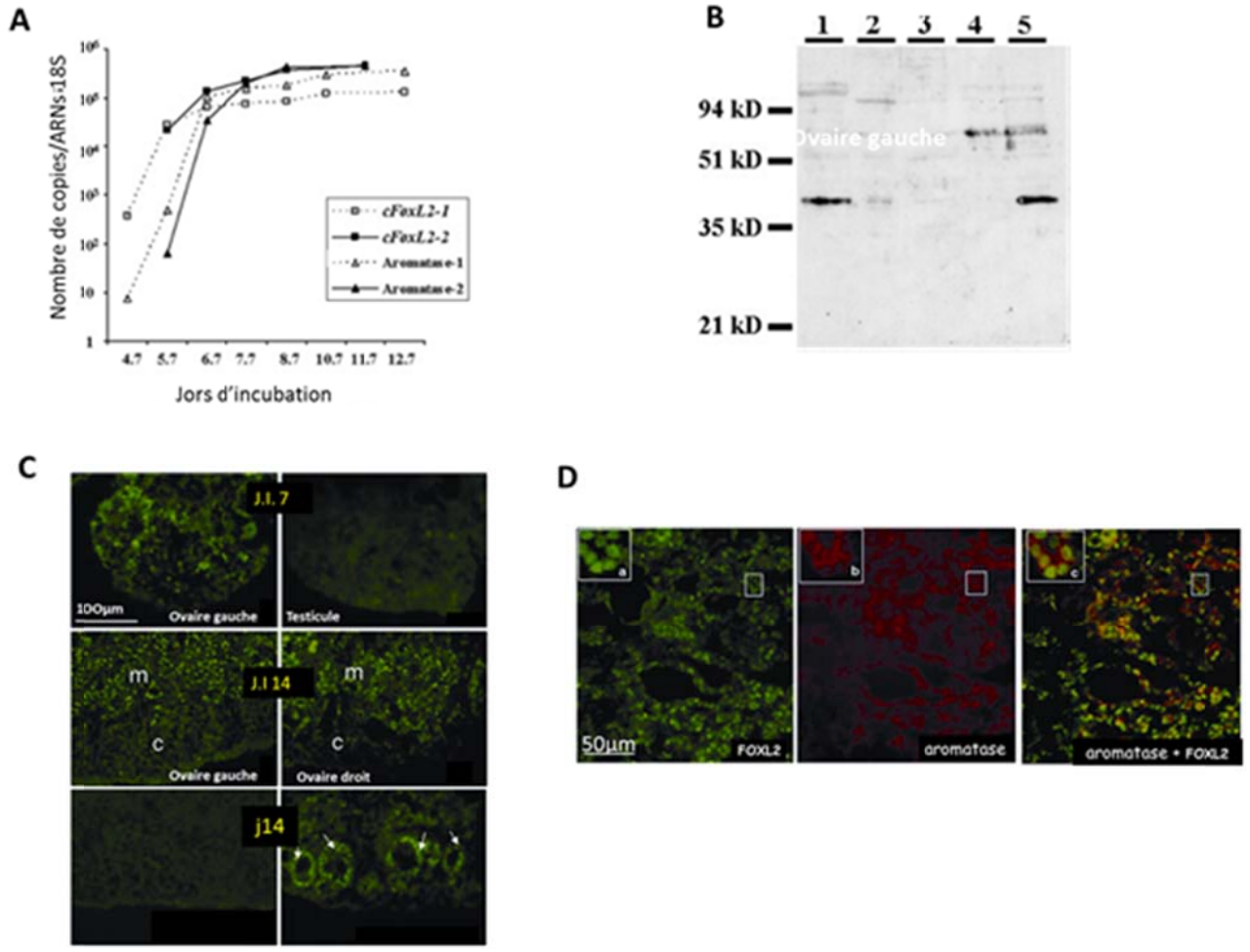


Figure 11. Expression du FOXL2 durant le développement ovarien. **A**. Les profils d'expression de *FOXL2* et d'*Aromatase* au cours de la différenciation ovarienne. **B :** Western blot avec l'anticorps anti hFOXL. 1-granulosa, 2-thèque, 3-testis, 4-cellules cos7 nontransféctées, 5- cos7 cellules transféctées avec pSG5-cFOXL2 ORF (open reading frame). **C.** Immunohistochimie avec l'anticorps anti-hFOXL2 à 3 stades du développement ovarien : 7et 14 jours d'incubation (J.I), 14 jours post éclosion. m, medulla ; c, cortex. Les flèches indiquent le marquage de FOXL2 dans les granulosa des follicules primordiaux.

.

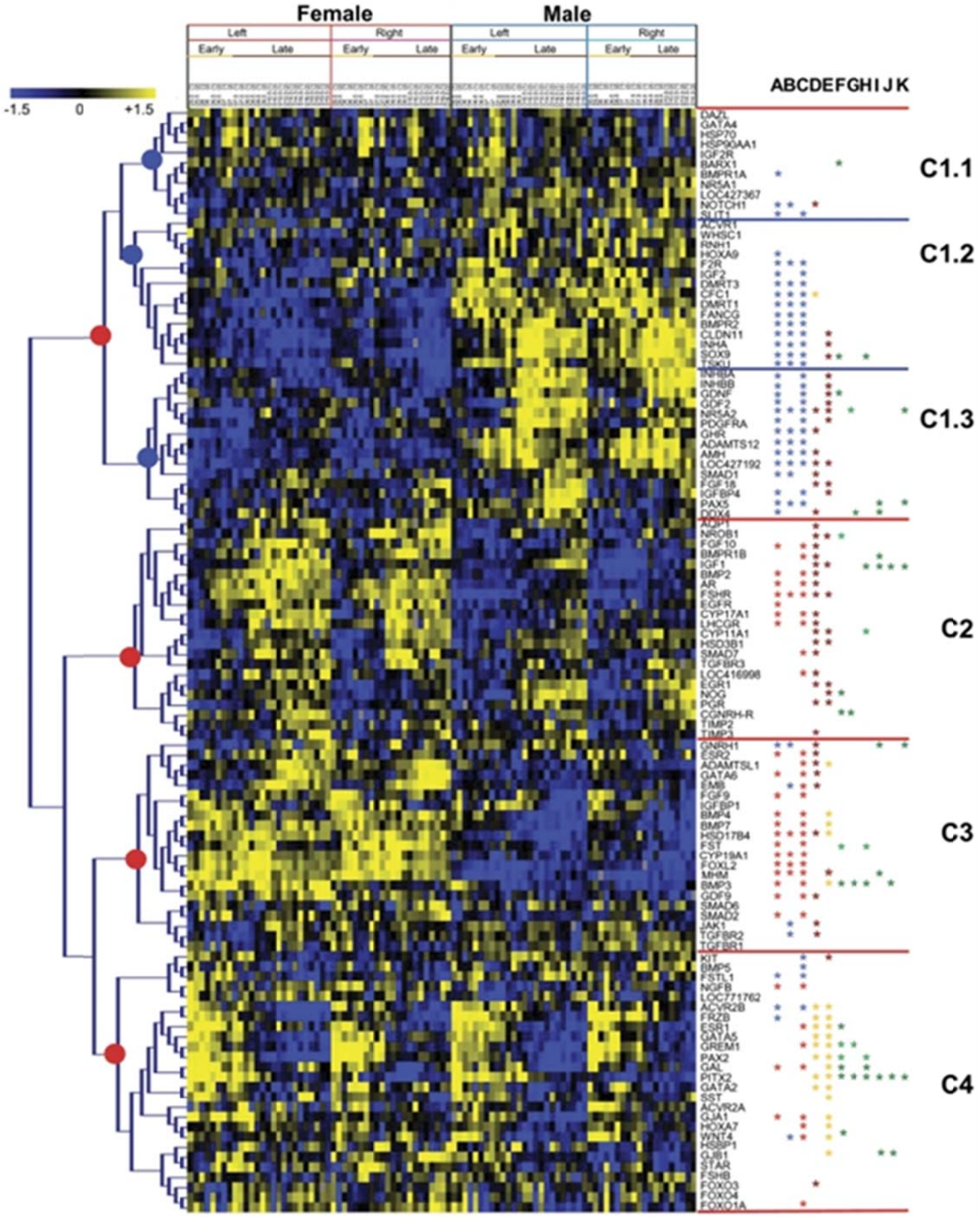
des gènes codant pour les facteurs de transcription possédant le domaine forkhead winged helix. Ce gène a été identifié dans le cadre du syndrome blepharophemosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome (BPES) caractérisé par une malformation ophtalmique (BPES 2) accompagnée dans certains cas d'insuffisance ovarienne (BPES 1) (Crisponi, *et al.* 2001). Chez les chèvres XX homozygotes pour une mutation de délétion d'une région du chromosome chi-1q43 causant pooled intersex syndrome (PIS) l'expression de FOXL2 en avale de cette région est abolie dans les gonades en différenciation et les bourgeons de cornes. L'abolition de l'expression de FOXL2 est accompagnée par la régulation négative de l'expression de CYP19A1 pendant la même période (Pailhoux, *et al.* 2002). Un lien entre FOXL2 et l'aromatase a été établi chez la chèvre, chez qui, comme chez le poulet, les estrogènes sont impliqués dans la différenciation ovarienne. En se basant sur ces travaux, j'ai choisi de cloner et étudier FOXL2 chez le poulet en tant que gène-candidat fort de l'activation et de la régulation de l'expression d'aromatase durant la différenciation ovarienne chez le poulet. J'ai réalisé ce travail en collaboration avec l'équipe «Déterminisme du Sexe et Différenciation Ovarienne Précoce» (DSDOP) de Jouy-en-Josas et J. Coquet (Inserm, hôpital Cochin). Dans le cadre de ce travail, j'ai encadré P. Duprix, l'étudiant d'IUT, pour un stage de fin d'étude. Le clonage et le séquençage du gène FOXL2 ont révélé des différences considérables entre la structure de FOXL2 des mammifères et du poulet. Ces différences concernaient notamment l'absence de la queue polyalanine caractéristique du Foxl2 des mammifères. Ce domaine est souvent sujet de mutations dans le syndrome génétique BPES qui peut affecter la fonction ovarienne chez l'humain. Notamment l'expansion de ce domaine est trouvée dans certains cas de BPES 1 et 2. Sur le plan moléculaire, cette expansion induit la perte de l'activité de FOXL2 envers les promoteurs des gènes cibles et dont la nature et le dégré sont différents en fonction des cibles (Moumne, *et al.* 2008). L'expansion des monopolymères d'acides aminés à travers l'évolution mène à l'augmentation de la taille des protéines et est associée avec un gain de fonction (Mortlock, *et al.* 2000). Le contenu élevé en alanine et proline a été associé dans les facteurs de transcription avec les domaines d'activation de transcription (McDowall, *et al.* 1999; Mitchell, *et al.* 1989), mais d'autre part les régions riches en alanine ou avec répétition d'alanine peuvent avoir l'activité de répression de transcription (Briata, *et al.* 1995; Hanna-Rose&Hansen 1996; Maurer, *et al.* 2003). Nos résultats sur la concordance des profils d'expression de *FOXL2* et d'aromatase durant la différenciation gonadique chez le poulet et la co-localisation de ces deux protéines dans les mêmes cellules dans les gonades embryonnaires des femelles suggèrent le rôle possible de FOXL2 dans l'activation et la régulation de l'aromatase durant ce processus (**Fig 11 A, C, D**). C'est le seul gène identifié qui serait activé au même moment que l'aromatase durant la différenciation ovarienne chez le poulet d'une façon complétement différentielle avec le testicule. Nous nous sommes également intéressés à l'expression du gène FOXL2 durant le développement postnatal et chez l'adulte. Comme chez les mammifères et les poissons FOXL2 est préférentiellement exprimé au niveau de l'ovaire dans les cellules de granulosa. Une différence importante avec les mammifères et les poissons consiste dans le fait que l'aromatase chez la poule est exprimé dans la thèque externe et non dans les cellules de granulosa, tandis que FOXL2 est 7 fois moins exprimé dans la thèque, que dans les cellules de granulosa (**Fig. 11B**).

De plus nous avons détecté le pic le plus élevé de l'expression de *FOXL2* dans le GDR de l'ovocyte ovulé (**Fig. 6**). Cette expression persistait durant le développement embryonnaire à des niveaux similaires à ceux détectés dans les cellules de granulosa et les GDR des follicules hiérarchiques et disparaissait 24h après l'ovulation avant l'activation du génome embryonnaire. Ces données sur l'expression de *FOXL2* dans l'ovaire posent une question sur le rôle qu'il peut jouer au niveau de ses différents sites d'expression (GDR, embryon, thèque, granulosa). Il serait très intéressant d'explorer son rôle durant la maturation ovocytaire et en particulier au moment de l'ovulation et le développement embryonnaire précoce et confirmer l'expression ovocytaire de FOXL2 par hybridation in situ et immunohistochimie. Une hypothèse serait que cette expression est due aux cellules de granulosa entourant le GD qui restent en petits quantité sur l'ovocyte après l'ovulation.

Pour pouvoir explorer la fonction de FOXL2 durant la différenciation ovarienne et la maturation folliculaire nous avons développé en collaboration avec le laboratoire des Biotechnologies Moléculaires de l'Institut d'Epidémiologie de Gamaleya les vecteurs adénoviraux exprimant FOXL2 et EGFP sous un promoteur inductible. Nous avons également développé une culture organotypique et dissociée des gonades embryonnaires décrite plus en détails dans les chapitres suivants et la culture des cellules de granulosa des follicules hiérarchiques. Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet RFBR INRA-RUSSIE ou j'ai encadré plusieurs étudiants russes pour des stages de courte durée (1-2 mois) et une stagiaire de Master 1 C. Bongibault. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'effet de la surexpression de FOXL2 sur l'expression de l'aromatase et d'autres gènes impliqués dans la différenciation gonadique dans les gonades embryonnaires mâle et femelle en culture ainsi que sur l'expression de STAR et d'autres gènes codant pour les enzymes de la stéroidogénèse dans la culture de cellules de granulosa. Nous avons mis en évidence la surexpression de *FOXL2* dans les gonades embryonnaires mâles et femelles inféctées par le vecteur Adeno-FOX-EGFP ainsi que dans les cellules de granulosa. La surexpression de FOXL2 avait comme conséquence une tendance à l'augmentation des niveaux de *CYP19A1* (aromatase) dans les gonades embryonnaire mâles en culture organotypique et dissociée et diminuer les niveaux de *STAR* dans les gonades femelles. La même tendance avait été observée sur les cellules de granulosa des follicules F1 et F2, ce qui est en accord avec l'effet de FOXL2 sur la steroïdogénèse trouvé dans les cellules mammaliens. Cependant ces données demandent à être confirmées puisque l'infection seule avec un vecteur contrôle avait une tendance de modifier les niveaux de *CYP19A1* et de *STAR* dans les cellules en culture et avoir un effet toxique sur les cellules.

En conclusion, mes travaux sur le gène FOXL2 ont mis en évidence son implication dans la différenciation et le développement ovarien, la maturation folliculaire et l'ovulation et suggère qu'une de ses fonction durant la différenciation ovarienne pourrait être la régulation de l'expression de CYP19A1.

Identification de nouveaux acteurs impliqués dans la différenciation chez le poulet (Publication 21).



La sortie du génome séquencé et d'un grand nombre d'EST du poulet dans les bases de données a permis d'élargir ma recherche des gènes impliqués dans la différenciation gonadique chez le poulet à un

Figure 12. Classification hiérarchique de profils d'expression de 110 des gènes au cours du developpement gonadique chez l'embryon de poulet.

Chaque ligne représente un gène, et chaque colonne représente un échantillon. Les échantillons en haut de la classification sont présentés selon le sexe (mâle et femelles), selon le côté (gauche ou droite) et selon le stade du développement. Chaque cellule de la matrice correspond à un niveau d'expression, avec le bleu pour sousexpression, jaune pour la surexpression, noir pour l'expression génique proche de la médiane (voir l'échelle de couleurs) et gris pour les valeurs manquantes. Les gènes sont groupés en fonction de leur profil d'expression dans tous les échantillons en utilisant la classification hiérarchique basé sur le coefficient de corrélation de Pearson matrice de similarité entre les gènes, et l'algorithme de liaison complète (complet linkage). Les clusters sont indiqués sur le côté droit de l'image. L'analyse différentielle a été réalisée avec Limma R package. Les gènes étaient considérés comme exprimés différentiellement si les valeurs de p ajustées selon la méthode de Benjamini et Hochberg sont inférieures à un seuil fixé à 0,05 pour le contraste testé: A) Analyse de tous les échantillons femelles gauches et de tous les échantillons mâles gauches. B) Analyse des échantillons femelles gauches précoces et des échantillons mâle gauches précoces. C) Aanalyse des échantillons femelles gauches tardifs et des échantillons mâles gauches tardifs. D) Analyse des échantillons femelles gauches précoces et tardifs. E) Analyse des échantillons mâles gauches précoces et tardifs. F) Analyse des échantillons femelles gauches et droites. G) Analyse des échantillons femelles gauches et et droites précoces. H) Analyse des échantillons femelles gauches et droites tardifs. I) Analyse des échantillons mâles gauche et droites. J) Analyse des échantillons mâles gauches et droites précoces. K) Analyse des échantillons mâles gauches et droites tardifs. Astérisques rouges indiquent surexpression dans les gonades femelles, astérisques bleus indiquent surexpression dans les gonades mâles, les astérisques marron indiquent la surexpression dans les échantillons tardifs, les astérisques orange indiquent la surexpression dans les échantillons précoces, les astérisques en vert foncé indiquent la surexpression dans les gonades gauche et les astérisques en vert clair indique la surexpression dans les échantillons droits.

grand nombre de gènes. Au début de cette recherche les outils de recherche sans *a priori* tels que les microarrays pangénomiques du poulet ou bien le RNAseq n'existaient pas encore. Pour cette raison, j'ai choisi de me tourner vers l'approche de gènes-candidats. Cent cinquante gènes ont été retenus incluant différentes familles de gènes connus pour être impliqués dans la reproduction, l'établissement de l'asymétrie et dans l'embryogénèse chez les vertébrés : facteurs de transcription, hormones et facteurs de croissance, récepteurs, enzymes de stéroidogénèse, facteurs impliqués dans l'apoptose, jonctions cellulaires, signalisation. Notre liste de gènes recoupe en partie celle retenue pour une recherche analogue réalisée par mes collègues chez la truite arc-en-ciel et la brebis. En se basant sur les résultats préliminaires 110 gènes ont été retenus pour l'analyse de leur cinétique d'expression par PCR en temps réel au cours du développement gonadique chez l'embryon du poulet. La classification hiérarchique des données de PCR en temps réel a permis d'identifier des clusters de gènes spécifiques au sexe et/ou au stade (précoce ou tardif) et/ou au côté gauche ou droit (**Fig. 12, 13, 14**). L'analyse statistique des données nous a permis d'identifier les gènes différentiellement exprimés dans différentes comparaisons testées. Une grande majorité des gènes (80,9 %) était différentiellement exprimée au moins dans une des comparaisons (**Fig. 12**). L'analyse de ces différentes comparaisons et des clusters nous a permis d'identifier les gènes qui pourraient jouer un rôle plutôt dans la différenciation gonadique précoce ou tardive, ovarienne ou testiculaire, et les gènes qui pourraient être impliqués dans l'asymétrie. L'analyse par hybridation in situ a validé l'expression différentielle pour trois gènes : *CLDN11*, *BMP4* et *ADAMTS12*, et précisé leurs localisation dans la gonade. Ici je vais m'arrêter sur quelques résultats. Un des résultats intéressants de cette analyse est l'expression différentielle de plusieurs membres de la famille TGFβ entre les deux sexes avec les bone morphogenetic proteins (BMPs) préférentiellement exprimés dans les gonades des femelles et les sous-unités d'inhibine et activine α, βA, βB très préférentiellement exprimés dans les gonades des mâles autour du moment critique de la différenciation du sexe. Contrairement aux sous-unités des inhibines et des activines plusieurs BMPs (BMP3, BMP4 et BMP7, (cluster C3) et BMP2, (clusters C2), ainsi que le récepteur BMPRIB et SMAD7 (cluster C2) étaient préférentiellement exprimées dans l'ovaire. Nos données suggèrent que le dimorphisme sexuel d'expression des BMPs n'est pas totalement conservé. Effectivement comme chez le poulet, BMP2 et BMP7 sont préférentiellement exprimés dans l'ovaire embryonnaire de souris et de la truite respectivement. Chez la souris BMP 7 est préférentiellement exprimé durant la différenciation testiculaire et l'expression de BMP4 n'est pas sexuellement dimorphique durant la différenciation gonadique chez la truite ((Baron*, et al.* 2005; Ross*, et al.* 2007). Ces BMPs peuvent jouer les rôles multiples, notamment elles peuvent être impliquées dans la prolifération des cellules germinales, comme c'est le cas durant la différenciation testiculaire chez la souris ou BMP2 et BMP4 exercent un effet mitogène sur les cellules germinales (Pellegrini*, et al.* 2003; Puglisi*, et al.* 2004). Les BMPs peuvent également être impliquées dans la régulation de la stéroidogénèse comme cela a été montré dans les cellules de granulosa chez le poulet et chez les mammifères (Elis*, et al.* 2007; Knight&Glister 2006). L'inhibine est exprimé chez la souris durant la différenciation testiculaire et impliqué dans la formation du vaisseau cœlomique. Cependant cette structure n'est pas identifiée chez le

poulet. D'autre part il a été proposé que l'inhibine et les activines pouvaient réguler la fonction des cellules interstitielles et stimuler la prolifération des spermatogonies (Moore*, et al.* 1994). Chez le poulet la fonction de ces gènes reste à explorer. CFC1 (CRYPTO) qui code pour un co-récepteur de Nodal, un autre membre de la famille TGBβ, est très préférentiellement exprimé dans le testicule à partir du jour 9,5 d'incubation, donc après la différenciation testiculaire. CFC1 dont le rôle dans l'établissement de l'asymétrie et la structuration de l'embryon est bien documenté (Tian&Meng 2006), empêche la signalisation de l'activine par la liaison au complexe ACTRIIA/IIB et également sa liaison au récepteur ACTRIB (Gray*, et al.* 2003). CFC1 pourrait donc réguler l'activité de l'activine durant le développement testiculaire.

Cette analyse a permis d'identifier également des gènes complétement nouveaux qui n'ont pas été étudiés auparavant dans le cadre de la différenciation gonadique comme par exemple ADAMTS12 et LOC427192 (cluster C1.3) (**Fig. 12, 13**), tous les deux localisés sur le chromosome sexuel Z et qui sont très préférentiellement exprimés dans le testicule à partir des stades précédant sa différenciation histologique qui a lieu le jour 6.5-7 d'incubation. Ces gènes sont particulièrement intéressants puisque leur régulation positive précède (pour LOC427192) ou coïncide (pour ADAMTS12) avec la régulation positive de SOX9 et AMH qui précède la différenciation histologique du testicule (Oreal *et al.* 1998). Cela pourrait suggérer que LOC427192 et ADAMTS12 peuvent réguler SOX9 et AMH et/ou être régulés par ces derniers. LOC427192 code pour une Serine/Threonine Kinase NIM-1, membre de la famille des AMPK-related kinases qui comporte aussi d'autres gènes spécifiques du testicule : SNRK and TSSKs (Hoshino*, et al.* 2005; Jaleel*, et al.* 2005; Porter*, et al.* 2005). Ce dernier gène est conservé chez le chimpanzé, le chien, les bovins, la souris, rat, le poulet, poisson zebre et le vers *C.elegans*, cependant très la fonction de ce gène est très peu connue; L'expression de NIM-1 a été détectée dans beaucoup de tissus chez le rat, mais les niveaux élevés d'activité de NIM1 ont été détecté uniquement dans le cerveau et le testicule. ADAMTS12 (desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs) est particulièrement intéressant puisqu' en plus de son rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire il est connu pour être inhibiteur de l'expression du SOX9 dans les chondrocytes *in vitro* (Bai*, et al.* 2009) Ce gène est exprimé dans les cordons testiculaires au moment de la différenciation morphologique du testicule chez le poulet , comme nous l'avons montré par hybridation *in situ*, et pourrait être unrégulateur de l'expression du gène SOX9. L'étude plus approfondie de ces gènes et des voies moléculaires dans lesquelles ils pourraient être impliqués durant la différenciation testiculaire chez le poulet et par approche comparée fait partie de mon projet de recherche. Nous avons également mis en évidence l'expression conservée du *CLDN11* très spécifique du testicule durant le développement. Nous avons montré par hybridation *in situ* que chez le poulet *CLDN11* était spécifiquement exprimé dans les cellules de Sertoli durant la différenciation comme chez la souris (Hellani*, et al.* 2000). CLDN11 est essentiel pour la formation des jonctions serrées et pour l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire. L'absence de CLDN11 amène à la stérilité masculine (Mazaud-Guittot*, et al.* 2010).

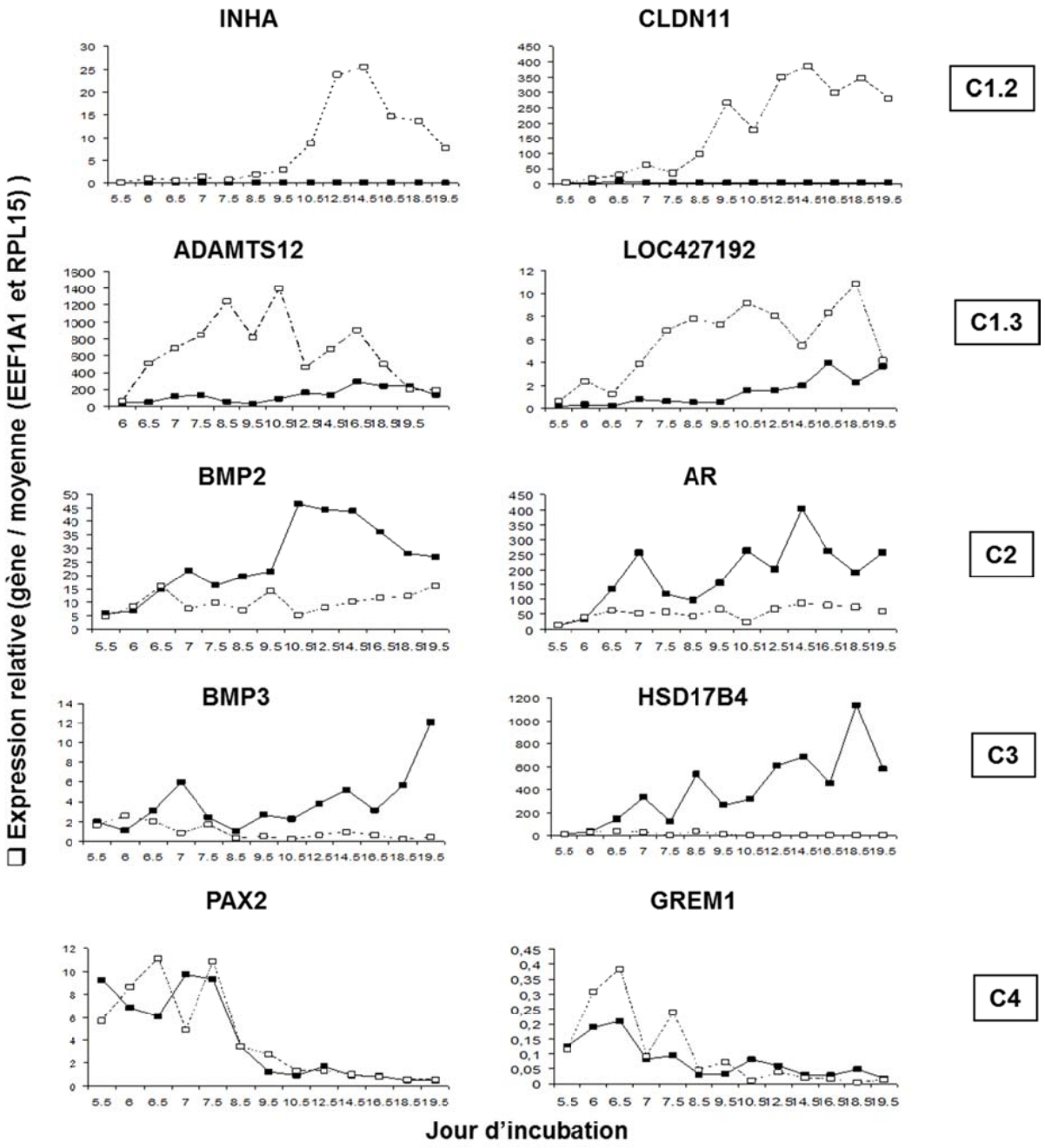


Figure 13. Exemple des profils d'expression représentatifs des clusters de gènes présentés sur la Fig.12 Les profils des gonades femelles sont présentés par les carrés noir et lignes noires. Les profils des des gonades mâles sont présentés par les carrés transparents et les lignes pointillées.

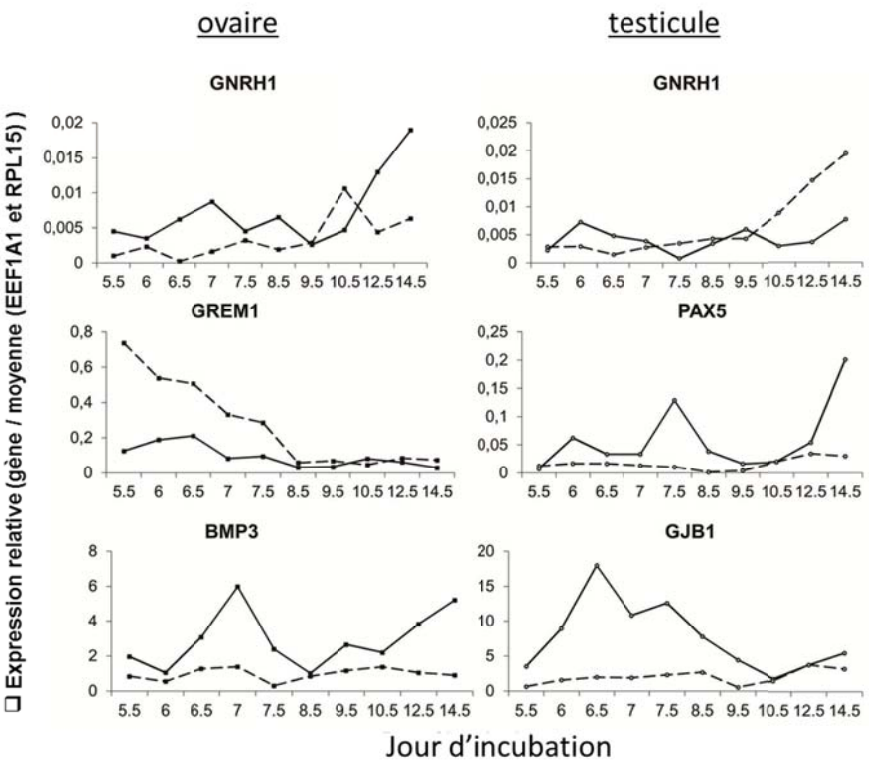
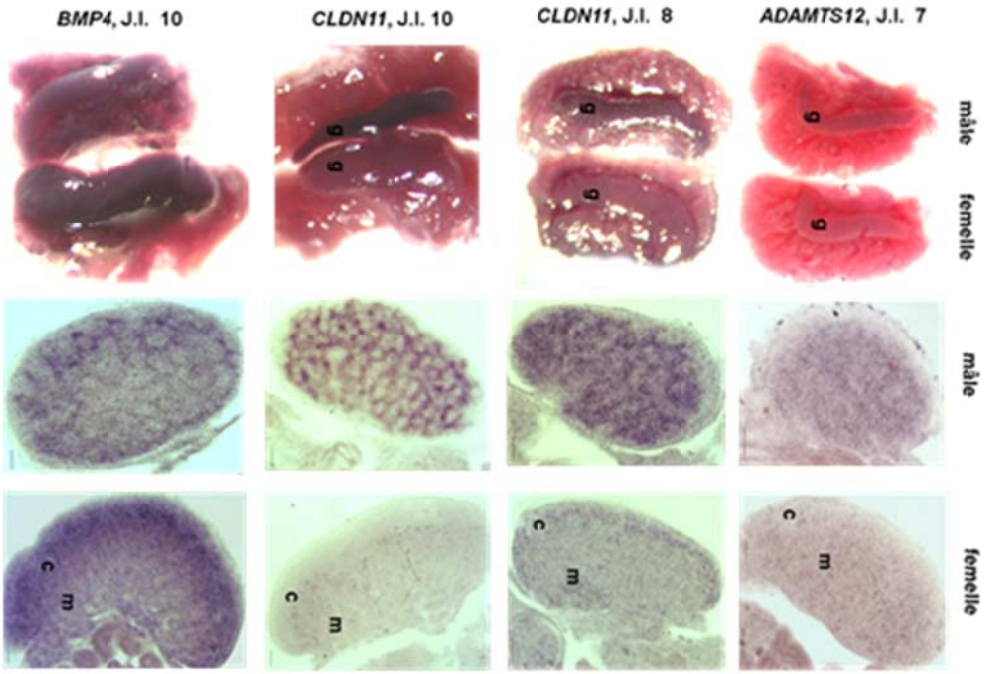


Figure14. Exemple des profils d'expression de gènes asymétriques. Les profils des gonades gauches sont présentés par les lignes noires continues. Les profils des gonades droites sont présentés par les carrés transparents et les lignes pointillées.



Figures 15.

L'analyse de l'expression des trois gènes : BMP4, CLDN 11 et ADAMTS 12 par hybridation *in situ*. J.I., jours d'incubation, C, cortex, m, médulla. Echèle : 50 µM.

Ce travail nous a également permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression était asymétrique entre la gonade gauche et la gonade droite chez les femelles comme chez les mâles ce qui reflète l'asymétrie innée des gonades chez l'oiseau. L'asymétrie au niveau moléculaire est établie très tôt durant la mise en place des gonades bien avant la différenciation morphologique. Ce phénomène est associé à l'expression asymétrique du gène PITX2 qui débute au stade 20 (jour 3 d'incubation) dans les ébauches gonadiques mâle et femelle uniquement du côté gauche (Guioli&Lovell-Badge 2007). Cette asymétrie est révélée sur le plan morphologique sous l'action des estrogènes chez les femelles, chez qui l'absence d'expression de ERα dans le cortex de la gonade droite suite à l'absence de l'expression de PITX2 amène à la régression de la gonade (Ishimaru*, et al.* 2008). Chez les mâles en absence des estrogènes cette asymétrie reste silencieuse et se révèle uniquement lors des traitements des embryons avant 6 jours d'incubation par les estrogènes qui induisent la féminisation de la gonade gauche et la régression de la gonade droite. Nous avons trouvé plusieurs gènes préférentiellement exprimés dans l'ovaire gauche (IGF1, CGNRH-R, BMP3, PITX2 and GAL) et dans le testicule gauche (NR5A2, PAX5, DDX4, IGF1, GNRH1, BMP3 and PITX2) (**Fig.14**). Les gènes préférentiellement exprimés dans l'ovaire gauche peuvent jouer un rôle dans le développement du cortex, qui n'est maintenu que du côté gauche. La présence des gènes différentiellement exprimés entre la gonade gauche et la droite chez les mâles reflète probablement le programme asymétrique initial présent chez les deux sexes. Au contraire, l'expression d'autres gènes, (NR5A2, NROB1, CYP11A1, EMB, FST, GREM1 and PAX2) augmentait à partir du jour 8 d'incubation dans l'ovaire droit et très probablement en lien avec la dysgénésie de l'ovaire droit (**Fig.14**).

Ce travail a donc enrichi notre connaissance du programme génétique de la différenciation gonadique chez le poulet. Il révèle également des similitudes avec d'autres vertébrés et met en évidence les spécificités aviaires (ex. expression asymétrique de plusieurs gènes, forte expression des gènes liés à la stéroïdogénèse dans les gonades femelles). Cette étude a fourni des nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués dans la différenciation gonadique chez le poulet et dont les fonctions précises dans ce processus ainsi que leur conservation restent à explorer.

Ce travail a en grande partie été réalisé dans le cadre de thèse de G. Carré que j'ai encadrée.

Etude de la fonction des gènes durant la différenciation gonadique chez le poulet, exemple de BMP4 et FSH (**publication 39, 40, 42 et en préparation pour soumission**).

Ce travail a été également réalisé dans le cadre de la thèse de G. Carré Le travail préliminaire sur la mise en place de la culture organotypique était l'objet des stages de deux étudiantes de M1 : C. Gallet et M. Provost.

L'embryon précoce du poulet est un modèle privilégié pour étudier la fonction des gènes impliqués dans le développement précoce et il est également un modèle pour comprendre certains mécanismes de cancérogénèse, notamment la transition mésenchyme-épithélium (Kain*, et al.* 2014). A ces fins les principales méthodes développées nécessitent l'utilisation de transgène pour moduler l'expression de gènes d'intérêt dans les cultures d'embryons *in vitro.* Un transgène peut être introduit

dans la partie cible de l'embryon par l'électroporation *in ovo* et *ex ovo* des plasmides contenant le transgène ou l'infection par les vecteurs adenoviraux permettant l'expression transitoire du transgène (Sauka-Spengler&Barembaum 2008). Cependant, ces méthodes ne conviennent pas pour l'étude de la fonction des gènes dont l'expression débute aux stades plus tardifs, comme c'est le cas des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle de la gonade. Dans ces dernières, années l'approche rétrovirale a été développée pour l'étude de la fonction des gènes durant la différenciation (Ayers, *et al.* 2013; Lambeth, *et al.* 2014). Bien qu'à l'heure actuelle ce soit l'approche la plus efficace, elle est lourde à mettre en place et ne permettait pas jusqu'à récemment l'étude de la misexpression du gène spécifiquement dans les gonades à cause de l'absence des promoteurs spécifiques des gonades développés. Nous avons choisi de développer la culture organotypique des gonades de l'embryon du poulet comme modèle pour explorer le rôle des gènes durant la différenciation gonadique chez le poulet. Elle est largement utilisée pour étudier le développement des gonades fœtales chez la souris et le rat (Livera, *et al.* 2006) ; c'est également un modèle unique utilisé pour acquérir les connaissances sur le développement des gonades fœtales humaines (Le Bouffant, *et al.* 2010). La culture organotypique des gonades embryonnaires a été utilisée en tant que complexe gonad-mesonephros pour étudier le rôle de FGF9 (Schmahl, *et al.* 2004) et PDGF (Smith, *et al.* 2005) dans le mécanisme de la migration cellulaire durant la différenciation gonadique chez la souris et dans le dernier cas aussi chez le poulet. Cependant cet outil a été très peu exploité dans l'étude de la régulation de la différenciation gonadique chez le poulet. Comme décrit ci-dessus nous avons essayé d'utiliser cette culture pour étudier le rôle du facteur de transcription FOXL2 à l'aide d'un vecteur adenoviral. Cependant elle est particulièrement intéressante pour étudier les effets des hormones et des facteurs de croissance. Les gonades embryonnaires de poulet peuvent survivre en culture jusqu'à 10-12 jours sans mesonephros et montrent le développement similaire à celui *in vivo* (Jordanov&Angelova 1984). Nous avons développé une culture organotypique des gonades embryonnaires sans mesonephros sur des inserts dans un milieu principalement décrit par (Jordanov&Angelova 1984) qui ne contenait ni sérum ni facteurs de croissance. Les gonades du poulet dans ces conditions gardent une bonne capacité de différenciation *in vitro*, ce qui est confirmé par l'expression des marqueurs testiculaires ou ovariens selon le sexe génétique de la gonade et par leur bonne capacité de production des stéroïdes (**Fig. 16**). Suite à nos précédants travaux nous avons voulu explorer le rôle que pourraient avoir les BMPs préférentiellement exprimées dans l'ovaire et les activines préférentiellement exprimés dans le testicule durant la différenciation. En première approche nous avons choisi BMP4 comme molécule modèle, puisque ses effets sur la fonction gonadique sont bien décrits. Cependant son rôle durant la différenciation gonadique chez le poulet est méconnu. Des études antérieures ont montré ses effets sur la stéroidogénèse ovarienne et la prolifération cellulaire ainsi que son effet mitogène sur les cellules germinales. L'implication des BMPs comprenant la BMP4 dans la régulation de la stéroïdognèse basale et induite par la FSH dans les cellules de granulosa a été décrite chez les mammifères et chez la poule adulte (Elis *et al.* 2007; Knight&Glister 2006). La stéroïdogénèse

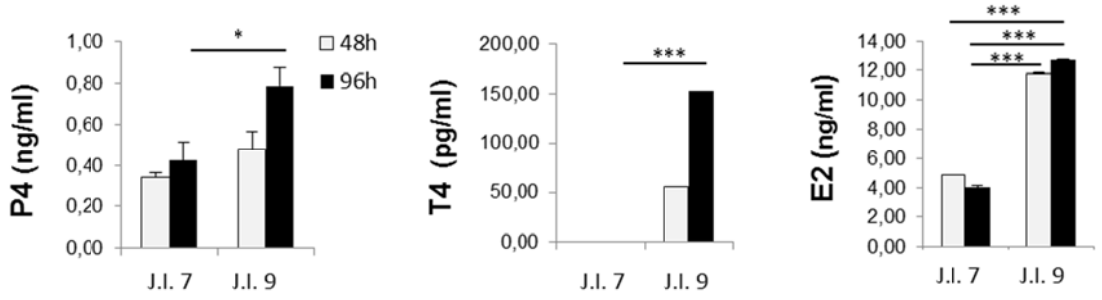


Figure 16. La production des stéroïdes par les ovaires embryonnaire mesurées dans le milieu de culture après 48h et 96h de culture. J.I, jour d'incubation. Les différences significatives sont indiquées par les étoiles. Les astérisques signifie les différences significatives (* $p<0.05$; ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$).

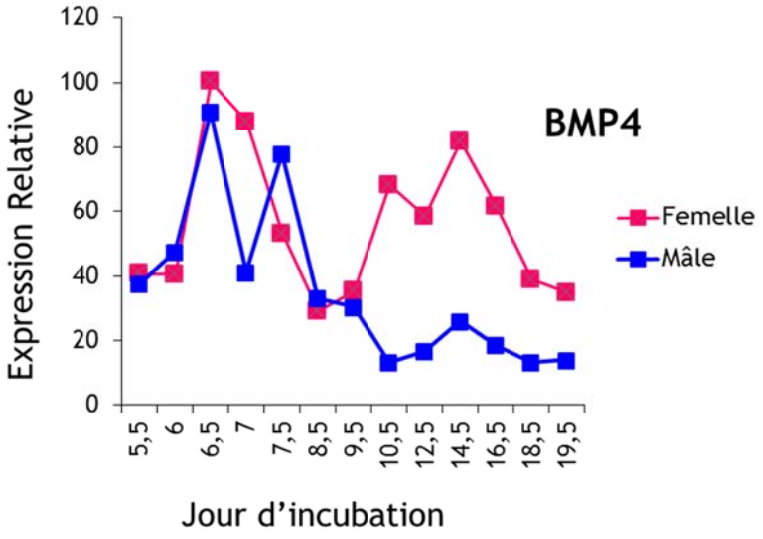


Figure 17. Profil d'expression de BMP4 durant le développement embryonnaire des gonades mâles et femelles gauches.

étant cruciale pour la différenciation ovarienne chez le poulet, nous avons émis l'hypothèse que ces BMPs pourraient entre autre réguler la stéroïdogénèse durant ce processus. Parmi les facteurs connus pour être impliqués dans la régulation de la stéroïdogenèse au cours de la différenciation des gonades chez le poulet, les gonadotropines FSH et LH stimulent la production de T4 (la testostérone) et d'E2 (estradiol) (Gomez*, et al.* 2001; Mendez-Herrera*, et al.* 1998; Pedernera*, et al.* 1999; Teng*, et al.* 1982; Velazquez*, et al.* 1997). La sous-unité β de la FSH a été détectée au jour 4,5 dans l'adénohypophyse de l'embryon de poulet (Woods*, et al.* 1985) et la protéine a été mesurée dans le plasma au jour 8 avec une valeur maximale au jour 10 (Rombauts*, et al.* 1993). Ces données suggèrent la possibilité de régulation du développement gonadique chez l'embryon par la FSH. En outre, le récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSHR) est exprimé dans les gonades embryonnaires de poulet de 4 jours, attestant de leur possible sensibilité à la stimulation par la FSH (Akazome*, et al.* 2002). En utilisant la culture organotypique des gonades et la BMP4 recombinante humaine (rhBMP4), nous avons étudié les effets de la BMP4 sur la stéroidogénèse et l'expression des gènes impliqués dans sa régulation dans les gonades mâles et femelles en culture en présence ou en absence de FSH. Nous avons choisi de réaliser notre étude sur les gonades mises en culture à deux stades différents du développement : 7 jours d'incubation et 9 jours d'incubation. Le premier stade correspond à la différenciation histologique des gonades. A ce stade l'expression de la BMP4 n'est pas significativement différente entre les gonades mâles et gonades femelles (**Fig. 17**). Le deuxième stade est caractérisé par le début de l'expression sexuellement dimorphique de BMP4 dans les gonades. Nous avons réalisé les cultures de 96h des gonades sur les inserts avec un changement de milieu 48h après la mise en culture et nous avons mesuré les niveaux de E2, T4, et P4 (progestérone) dans les milieux à 48 et 96 h et l'expression de gènes dans les gonades après 96h de cultures (**Fig. 18**). Cette étude a tout d'abord apporté de nouvelles connaissances sur l'action possible de la FSH durant la différenciation des gonades du poulet. En plus de son effet positif sur la production de E2 et de T4 dans les ovaires embryonnaires et de T4 dans le testicule embryonnaire la FSH augmentait fortement leur production de la progestérone, ce qui nous amène à une hypothèse d'un possible rôle au niveau de la gonade embryonnaire (en plus de sa fonction d'être précurseur d'androstendione). Nous avons montré dans l'étude précédente (Carre*, et al.* 2011) que les ovaires et les testicules embryonnaires exprimaient le récepteur à la progestérone (PR) suggérant son action paracrine. Chez le rat la formation des follicules débute au cours du développement postnatal, ce qui est également le cas chez le poulet, et son développement ovarien est caractérisé comme chez le poulet par la sécrétion importante de P4 (Kezele&Skinner 2003). La supplémentation de la culture d'ovaires de rat prélevés à la naissance par P4 prévient la formation des follicules primaires. Cela conduit à une hypothèse que chez le poulet comme chez le rat la progestérone pourrait empêcher le démarrage de la folliculogénèse durant la vie embryonnaire. La sensibilité des gonades mâles et femelles augmente avec l'âge des gonades mises en culture, ce qui est suggéré par l'expression plus importante de FSHR dans les cultures des gonades prélevées à jour 9 d'incubation chez la femelle et par la réponse plus importante à la stimulation par la FSH des gonades de jour 9 d'incubation en culture que de celles de jour 7 d'incubation en terme de

production de stéroïdes. La sensibilité des testicules en culture étaient également beaucoup plus faible que celle des ovaires, comme le témoignent les niveaux beaucoup plus bas des stéroïdes produits par les premiers en réponse à oFSH (FSH ovine) et les niveaux des transcrits de FSHR presque indétectables dans les gonades mâles en culture ce qui est en cohérence avec le dimorphisme sexuel connu de l'expression de FSHR durant la différenciation gonadique chez le poulet (Akazome *et al.* 2002; Carre *et al.* 2011). En cohérence avec son effet positif sur la production des stéroïdes, la FSH stimulait l'expression des gènes codant pour les enzymes de la stéroidogénèse *STAR*, *CYP11A1*, *HSD3B1*, *CYP17A1* dans les testicules et les ovaires (**Fig. 19A)** avec les réponses en terme des niveaux d'expression toujours plus faibles et moins marqués chez les mâles que chez les femelles. Par contre oFSH n'avait pas d'effet sur l'expression de FSHR ni sur les régulateurs connus de la stéroidogénèse SF1et FOXL2.

Comme mentionné ci-dessus l'AMH est préférentiellement et SOX9 est exclusivement exprimé dans les testicules durant la différenciation. Le résultat intéressant de cette étude est l'effet inhibiteur de la oFSH sur l'expression de l'AMH dans la culture des testicules et des ovaires de 9 jours d'incubation, et de SOX9 dans la culture des testicules de 9 jours d'incubation. Dans les testicules adultes chez les mammifères, au contraire la FSH stimule l'expression et la sécrétion d'AMH corrélée à une augmentation de la prolifération des cellules de Sertoli et à une régulation positive de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'AMH (Al-Attar*, et al.* 1997; Lukas-Croisier*, et al.* 2003; Young*, et al.* 2003). En outre, la diminution de l'AMH sérique observée au cours du développement fœtal chez les souris coïncide avec l'augmentation de la concentration de T4 intratesticulaire suggérant une régulation négative de l'AMH par les androgènes (Rey*, et al.* 1993). De plus, des souris impubères Tfm, qui sont insensibles aux androgènes en raison d'une mutation dans le récepteur des androgènes (AR), présentent une expression d'AMH induite par la FSH plus élevée que le contrôle ce qui confirme l'implication des androgènes dans la régulation négative de l'AMH (Al-Attar *et al.* 1997). Ainsi, dans notre modèle, la régulation négative de l'AMH par la FSH pourrait être la conséquence de l'augmentation de la sécrétion de T4 par cette gonadotrophine. Cette hypothèse pourrait être envisagée puisque les ovaires et les testicules embryonnaires de poulet expriment les récepteurs aux androgènes (*AR*) (Carre *et al.* 2011; Katoh*, et al.* 2006). Toutefois, le niveau d'expression d'AR est inférieur dans les testicules embryonnaires par rapport à celui dans les ovaires embryonnaires ce qui pourrait conduire à la plus faible sensibilité aux androgènes des testicules permettant une expression plus élevée de l'AMH dans les testicules par rapport aux ovaires. D'une manière similaire à la régulation négative de l'expression de l'*AMH*, oFSH diminuait l'expression de *SOX9* dans les testicules embryonnaires. Cependant, si chez les mammifères SOX9 est un régulateur bien connu de l'*AMH* (Arango*, et al.* 1999; De Santa Barbara*, et al.* 1998), cette relation n'a pas été prouvé chez le poulet, bien que le promoteur de l'AMH de poulet contienne l'élément de réponse SOX (Eusebe*, et al.* 1996; Oreal *et al.* 1998; Takada*, et al.* 2005). Ainsi, la régulation négative de l'AMH par la FSH peut être due aussi à l'inhibition de l'expression de SOX9. L'inhibition de SOX9 ne peut pas être démontrée dans les ovaires embryonnaires du poulets vu les niveaux extrêmement bas de SOX9 qu'ils

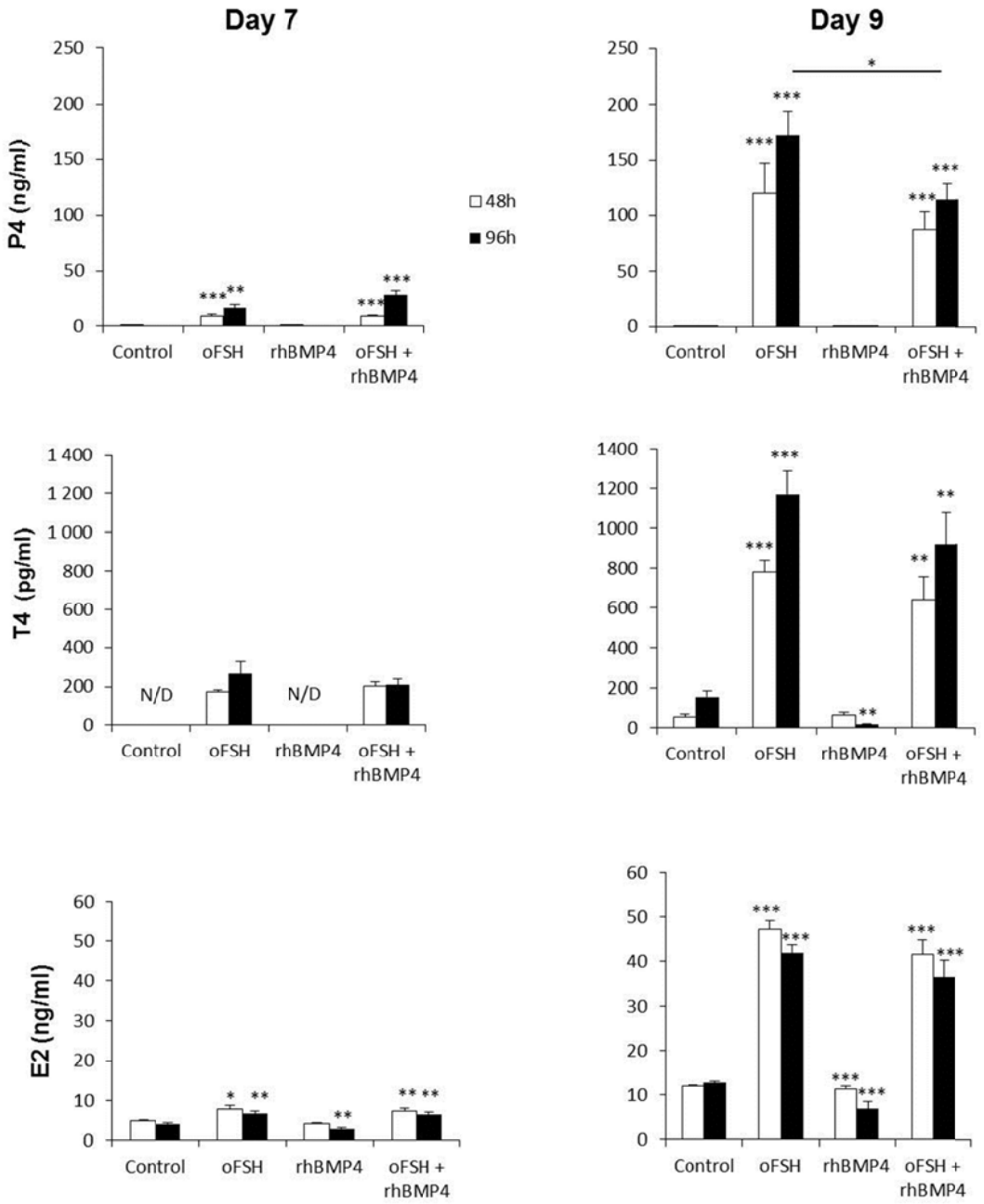


Figure 18. Effet de la FSH et la BMP4 sur la production des stéroïdes par les ovaires embryonnaires de 7 jours et de 9 jours d'incubation en culture. Les données sont représentées en tant que moyennes des données d'au moins six expériences indépendantes ± SEM. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les traitements et témoins (* p <0,05; ** p <0,01 et *** p <0,001).

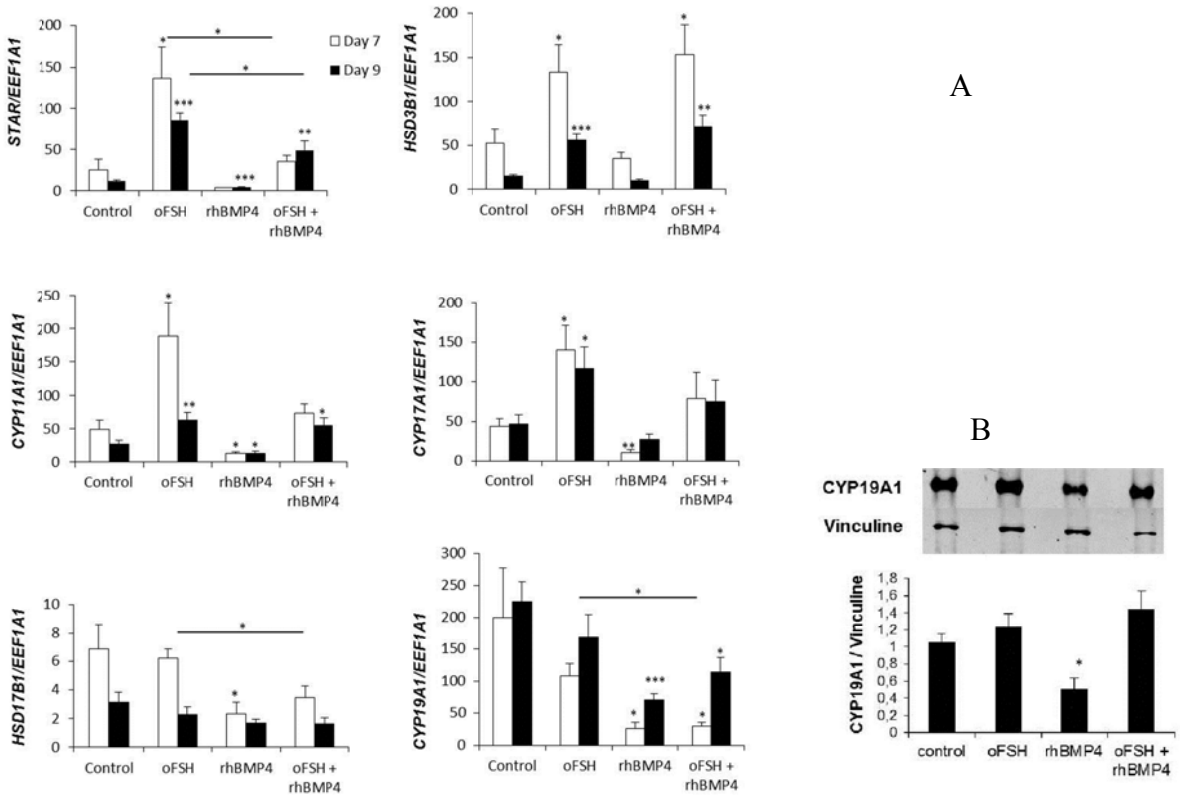


Figure 19. L'effet de la BMP 4 sur l'expression basale et induite par la FSH des enzymes de la stéroïdogénèse dans les ovaires embryonnaires du poulet, prélevés à jour 7 (barres blancs) ou à jour 9 (barres noires). **A**. L'expression des transcrits évaluée par QPCR. **B.** L'expression de la CYP19A1 (aromatase) évaluée par (Western blot).

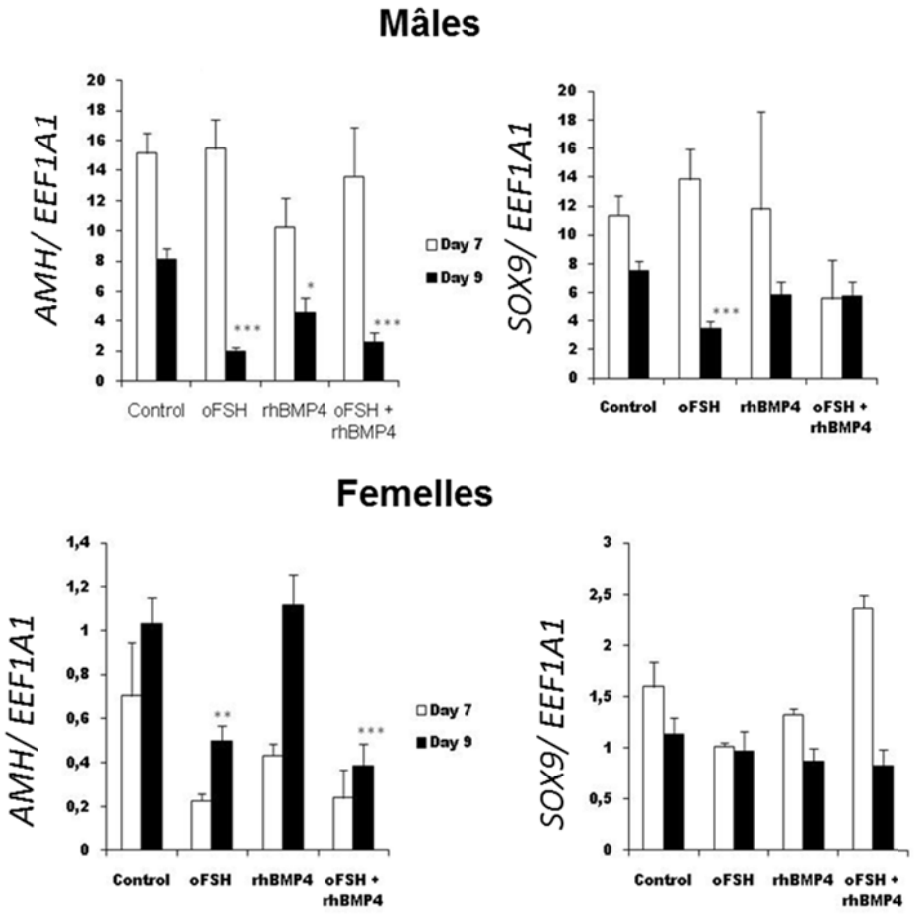


Figure 20.
L'effet de de la FSH et/ou de la BMP 4 sur l'expression des transcrits *AMH* et *SOX9* évaluée par QPCR. B dans les gonades mâles et femelles de 7 ou 9 jours d'incubation après 9**6** de culture.

expriment. Ainsi dans les ovaires la FSH pourrait être un facteur qui contribue au maintien des niveaux bas de l'AMH durant le développement ovarien empêchant l'expression du programme mâle dans les ovaires. La FSH ainsi pourrait être le facteur antitesticulaire. Quant à la BMP4, nous avons montré que la rhBMP4 avait un effet global inhibiteur sur la stéroïdogénèse basale et induite par la FSH dans l'ovaire et dans le testicule. En particulier rhBMP4 diminuait i) la production de P4 basale et induite par la FSH dans la culture de testicules des jours 7 et 9 d'incubation et la production de P4 induite par la FSH dans la culture des ovaires de 9 jours d'incubation, ii) la production de T4 dans la culture de testicules de 9 jours d'incubation, iii) la production de E2 basale et induite par la FSH. Nous avons montré que cet effet de rhBMP4 passait par l'inhibition de la transcription des enzymes de la stéroïdogénèse (**Fig. 19A**) L' effet inhibiteur des BMP (BMP4, BMP6 et BMP15) sur la production de P4 stimulée par la FSH a été décrit dans les cellules de la granulosa des mammifères et de la poule (Elis *et al.* 2007; Otsuka*, et al.* 2001a; Otsuka*, et al.* 2001b; Pierre*, et al.* 2004). L'inhibition de la sécrétion de T4 passant par l'inhibition de l'expression de *CYP17A1* décrit ici est similaire à l'effet inhibiteur connu des BMP4, 6 et 7 sur la production des androgènes, basale et induite par LH par la culture des cellules de la thèque bovine (Glister*, et al.* 2004) et dans le modèle de culture des cellules tumorales ovariennes humaines (Dooley*, et al.* 2000). Nous avons décrit pour la première fois l'effet inhibiteur de rhBMP4 sur la production des estrogènes et sur l'expression du transcrit et de la protéine de CYP19A1 (aromatase), impliquée dans leur synthèse (**Fig. 19 A,B**). La BMP4 exerçait cet effet seule ou en présence de FSH et sur la culture des gonades de 7 et de 9 jours d'incubation. En effet, dans les cellules de la granulosa de mammifères, les BMPs soit n'ont aucun effet sur la production d'E2 dans les cellules de granulosa, comme c'est le cas chez le rat, soit sont des stimulateurs de la production d'E2 dans les cellules de granulosa, comme c'est le cas chez les ruminants (Glister *et al.* 2004; Souza*, et al.* 2002). L'effet inhibiteur de BMP4 sur la production d'E2 que nous avons trouvé dans la culture des ovaires embryonnaires du poulet pourrait être nécessaire pour maintenir E2 à un niveau physiologique et éviter ainsi sa possible action toxique sur le développement de l'ovaire et de l'oviducte, puisque l'ovaire embryonnaire du poulet a naturellement une activité stéroïdogène forte et produit une grande quantité d' E2. En effet, plusieurs études ont montré que l'exposition *in ovo* d'embryons de caille à des œstrogènes de synthèse raccourcit d'une manière dose-dépendent l'oviducte gauche et induit un développement anormal de l'oviducte droit et de l'utérus accompagné d'un amincissement ou de l'absence de la coquille (Berg*, et al.* 2001; Kamata*, et al.* 2006). L'effet limitant de la BMP4 sur la production des estrogènes pourrait également être impliqué dans un switch des cellules germinales primordiales de la prolifération vers l'initiation de la méiose. Le traitement simultané des embryons de poulet de jour 13,5 d'incubation avec oFSH et l'inhibiteur de l'aromatase, qui bloquent la synthèse des oestrogènes stimulée par la FSH, inhibe la mitose et accélère la méiose (He*, et al.* 2013).

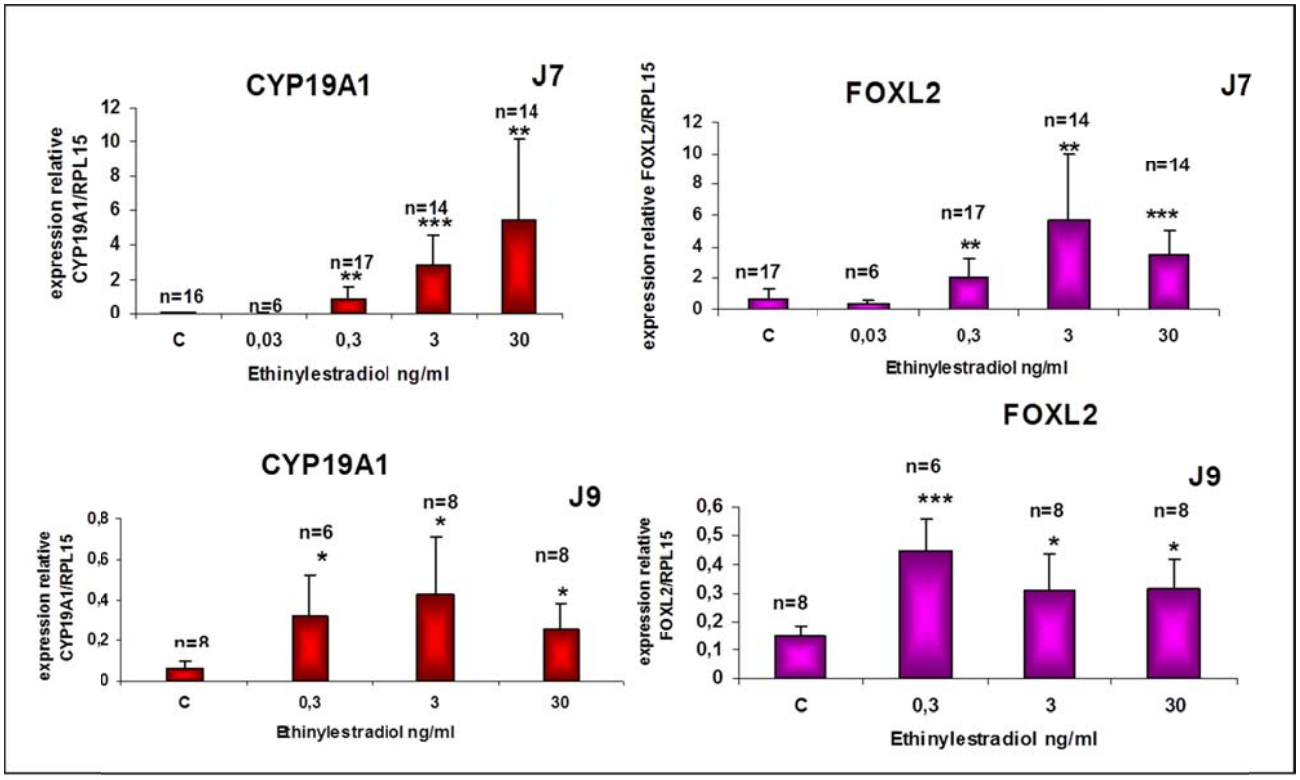


Figure 21. Analyse par RT–QPCR de l'expression des marqueurs ovariens *CYP19A*1 et *FOXL2* dans les testicules embryonnaires mis en culture à 7 ou 9 jour d'incubation (J.I.) et cultivés pendant 96h en présence ou non de doses croissantes d'EE2. Les réplicats biologiques (n) proviennent de 6 expériences indépendantes pour le stade J.I. 7 et de 3 expériences indépendantes pour le stade J.I. 9. Chaque réplicat représente un pool de 3 gonades cultivées sur le même insert. Une analyse statistique ANOVA a été réalisée à l'aide du logiciel StatView. Les étoiles représentent les différences significatives observées par rapport au contrôle (c) : *- $p<0,05$, **-$p<0,01$, ***-$p<0,001$.

Cultures organotypiques des gonades embryonnaires du poulet et perturbateurs endocriniens (publication 44, 45) .

L'oiseau est un modèle particulièrement adapté à des études de repro-toxicité environnementale ou agricole (puisque les oiseaux sont en contact direct avec les produits phytosanitaires à l'état sauvage (traitement des semences et des céréales,…) ou dans les productions avicoles (traitement des céréales pendant leur stockage par des pesticides, traitement des bâtiments avicoles avec des retardateurs de flamme,…). Comme décrit ci-dessus les gonades embryonnaires sont caractérisées par une grande sensibilité envers les estrogènes au moment de leur différenciation. Il est même possible d'obtenir les inversions du sexe phénotypique en administrant les estrogènes dans les œufs contenant les embryons ZZ ou les inhibiteurs d'aromatase qui bloquent la synthèse des estrogènes dans les œufs contenant les embryons ZW [8]. Le développement de la culture organotypique des gonades pour tester les faibles doses des perturbateurs endocriniens ayant une activité estrogénique (Ethinylestradiol (EE2) et le phthalate de mono-(2-ethylhexyle) (MEHP)) étaient l'objet de notre travail dans le cadre du projet « Specific Tools and Methods for Reprotoxicity » **(**STORM) financé par INERIS. Nous avons montré l'action très marquée des faible doses (à partir de 300 ng/L) d'EE2 sur l'activation d'expression de deux gènes ovariens majeurs *CYP19A1* et *FOXL2* dans les testicules embryonnaires du poulet mis en culture au moment de la différenciation sexuelle (Jour 7 d'incubation) et au stade bien différencié (Jour 9 d'incubation) après 96h de culture (**Fig. 21**) . A la fin des années 90, des analyses à la surface des rivières en Europe ou en sortie de stations d'épuration ont montré que la concentration de EE2 était comprise entre 0,5 à 7 ng/l (Desbrow et al. 1998; Larsson et al. 1999; Ternes et al. 1999) avec des pics pouvant atteindre 50 ng/l (Ahern & Briggs 1989 ; Leroy et al., 2006). Bien que les doses utilisées de E2 dans nos cultures sont de 6 à 1000 fois supérieures aux niveaux trouvés dans les milieux, elles restent très proches des systèmes de culture de gonades développés chez les poissons considérés comme très sensibles.

PERSPECTIVES

Depuis 2007, mon équipe est désormais rattachée à l'UMR PRC et ces dernières années ses travaux qui étaient initialement développés uniquement sur les espèces aviaires (la qualité des gamètes et développement embryonnaire) ont progressivement évolué vers la l'étude du développement gonadique (embryonnaire et postnatal) et postgonadique en utilisant trois principaux modèles animaux (poulet, souris, cheval) avec les applications sur plusieurs races et espèces (ex. dindon, oie, âne). L'étude des facteurs gonadiques et postgonadiques impliqués dans le développement des cellules germinales en gamètes fonctionnels capable de féconder (spermatozoïdes) ou d'être fécondés (ovules) et de donner un organisme viable est au cœur de nos travaux. Dans ce contexte, nos recherches visent 1) à acquérir une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans l'acquisition et le maintien de la capacité procréatrice des cellules germinales à différentes étapes du développement gonadique et post-gonadique, 2) à développer de nouvelles biotechnologies pour la gestion des ressources génétiques des animaux d'élevage et à optimiser les performances de leur reproduction. Effectivement

mon équipe est de plus en plus impliquée dans la recherche liée à la gestion de la biodiversité et au développement de nouvelles biotechnologies dans ce domaine notamment à travers les projets ANR (ANR International CRYOBIRDS), Infrastructure (CRB ANIM)), Région Centre (VALBIODI) déjà obtenus et du projet Européen IMAGE en cours de préparation et ANR international « GermDuck » en cours de soumission. Une meilleure gestion de la diversité génétique chez les animaux domestiques est un enjeu important pour la production durable de protéines destinées à l'alimentation humaine et pour la gestion de la biodiversité. Durant les dernières décennies, une diminution de la variabilité génétique liée à la restructuration rurale et les besoins commerciaux a été observée dans plusieurs espèces dont les espèces avicoles (Muir*, et al.* 2008) . Cette variabilité reste en partie présente dans les races anciennes ou locales à petits effectifs exposées à la consanguinité et aux risques sanitaires et donc menacées de disparition (ex. influenza aviaire). Le développement de nouvelles biotechnologies de la reproduction pour la gestion des ressources génétiques doit permettre de conduire à un autre niveau la maîtrise de la reproduction chez les animaux domestiques et d'assurer la sauvegarde du patrimoine génétique des races ou gènes en danger de disparition. Comprendre les facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux impactant la qualité des cellules à potentiel germinal destinées à être préservées comme réservoir de diversité génétique animale et proposer de nouvelles méthodes de conservation et d'utilisation de ces cellules constituent des enjeux de sécurité alimentaire. Chez les espèces aviaires une voie commune de préservation de ressources génétiques est la cryopréservation de la semence. Cependant si cette technologie est développée avec succès chez le poulet, elle demande de considérables adaptations chez chaque nouvelle espèce, et chez certaines espèces elle est difficile à développer (ex. caille). De plus comme le sexe hétérogamétique chez l'oiseau est la femelle le patrimoine du chromosome W n'est pas conservé dans ces conditions. D'autres voies de conservation envisageables sont : la cryopréservation du tissus ovarien, celle des cellules germinales primordiales (CGPs), ou de cellules somatiques en vue de reprogrammation en CGP via un passage par des cellules souches pluripotentes induites (iPS). Ces trois voies sont loin d'être suffisamment avancées pour être utilisées dans les biotechnologies de reproduction ou de gestion de la biodiversité et représentent à l'heure actuelle un objet de recherche. Si la cryopréservation et le transfert de tissu ovarien étaient bien maîtrisés, cette voie pourrait être assez efficace puisque une greffe bien développée peut produire beaucoup d'œufs et donc donner beaucoup de descendants issus de l'animal donneur. Cependant un seul laboratoire, aujourd'hui fermé, a réussi jusqu'à présent à obtenir une descendance à partir de cette voie et à développer le programme de cryobanking des gonades aviaires au Canada pour des races aviaires à petits effectifs (Silversides*, et al.* 2013). Les iPS obtenus par exemple à partir des cellules sanguines ou des fibroblastes de la peau cryopréservés pourraient être une voie prometteuse de restauration des patrimoines génétiques aviaires en théorie, mais la recherche sur les iPS aviaires est en retard par rapport à celle chez la souris et chez l'humain. Les iPS ont été obtenus récemment chez la caille et chez le poulet et des embryons chimériques ont été générés après leur transfert dans l'embryon receveur au stade blastoderme (Lu*, et al.* 2014; Lu*, et al.* 2012; Yu*, et al.* 2014), mais la production des gamètes fonctionnels après leur transfert dans les

embryons receveurs n'a jamais été démontrée. Le transfert des CGPs aviaires après multiplication en culture et cryopréservation présente à l'heure actuelle l'alternative la plus aboutie de conservation et de restauration des ressources génétiques aviaires. L'établissement de cultures permanentes de ces cellules (van de Lavoir*, et al.* 2006a) a facilité considérablement la manipulation des CGPs, a permis de les cryopréserver et d'améliorer le pourcentage de chimères germinales et de transmission à la descendance des génomes de ces cellules après leur transfert intra- ou inter- espèce (Nakamura*, et al.* 2013a). L'amplification de CGPs en culture a également permis d'étudier les mécanismes moléculaires et les facteurs impliqués dans le maintien de leur compétence germinale. Cependant le pourcentage de transmission des CGPs à la descendance varie beaucoup (0,1-69 %) et reste bas dans la plupart des cas (Nakamura *et al.* 2013a). L'obtention des cultures de CGPs à partir des embryons femelles a été décrit par un seul laboratoire et leur compétence germinale disparaît avec le temps dans les cultures, beaucoup plus rapidement que celle des CGPs issus des embryons mâles (Song*, et al.* 2014; van de Lavoir *et al.* 2006a). Malgré les progrès considérables réalisés ces dernières années dans la manipulation, la maîtrise des cultures, la cryopréservation des CGP, leur transmission après transfert dans l'organisme receveur reste insatisfaisante. De plus les cultures des CGPs femelles ne sont pas maîtrisées et les facteurs moléculaires impliqués dans les spécificités sexuelles du comportement des CGPs dans les cultures et après le transfert sont méconnus. Au sein des projets liés à la conservation des ressources génétiques aviaires dans lesquels mon équipe est impliquée, ces trois voies alternatives de conservation des cellules à potentiel germinal brièvement présentées ci-dessus sont explorées par différentes équipes participant. Dans ce contexte, en me basant sur mon expérience et mes connaissances dans le domaine de la différenciation gonadique et du développement embryonnaire précoce chez l'oiseau, j'oriente progressivement ma recherche vers les cellules germinales primordiales aviaires et leurs interactions avec les cellules somatiques de la gonade embryonnaire en différenciation avec comme objectifs : i) acquérir une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place et le maintien de leurs propriétés germinales, ii) optimiser les différentes étapes de manipulation de CGPs mâles et femelles conduisant à l'obtention des chimères germinales et à la transmission efficace de ces cellules dans leur état non altéré à la descendance. Le développement *in vitro* des CGPs dans les gonades dépend du dialogue qui s'établit entre ces cellules et les cellules somatiques de la gonade. Une connaissance approfondie de la différenciation et du fonctionnement des gonades embryonnaires est donc nécessaire pour bien connaitre les facteurs génétiques et épigénétiques qui contrôlent les différentes étapes du développement des CPGs mâles et femelle. Cette connaissance permettra aussi de créer les conditions optimales et bien définies du maintien et de la prolifération de ces cellules *in vitro* et après leur transfert dans l'embryon receveur *in vivo.* Dans ce contexte une partie de mon projet implique également l'exploration de la fonction et de l'évolution des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle de la gonade du poulet identifiés dans mes études précédentes et également l'identification de nouveaux acteurs de ce processus. Dans les pages suivantes je vais aborder plus en détails ces différentes parties de mon projet.

.

Les Cellules Germinales Primordiale Aviaires

Introduction

Le développement des CGPs aviaires a été principalement étudié chez deux oiseaux-modèles : le poulet et la caille. La spécification des CGPs aviaires bien qu'elle implique certains mécanismes conservés, semble être très différente de celle décrite chez les mammifères. Les CGPs aviaires sont de plus beaucoup moins bien étudiées que celles de la souris. Elles peuvent être identifiées par leur taille importante comparée aux cellules somatique et par les colorations histochimiques par les acides périodiques de Shiff (PAS) (Fujimoto*, et al.* 1976; Meyer 1960), et immunohistochimiques par la détection d'antigènes de surface, en particulier stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA1) (Karagenc*, et al.* 1996). Cependant ces marqueurs ne sont pas assez spécifiques pour étudier le développement *in vivo* et leur survie en culture (Pain*, et al.* 1996). Le développement des PGCs a pu être véritablement étudié après l'identification du gène DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4) ou chicken vasa homolog (CVH), et le développement de l'anticorps contre CVH (Tsunekawa *et al.* 2000). DDX4 ou VASA est une hélicase d'ARN très conservé dans l'évolution, depuis les invertébrés jusqu'à l'homme. Elle est spécifique des cellules germinales et essentielle pour leur développement (Lasko 2013). Deux modèles différents ont été décrits pour le développement des cellules germinales dans le règne animal (Extavour&Akam 2003). Selon le premier modèle, décrit chez la drosophile, le ver *Caenorhabditis elegans* et le xenope (Xenopus), la spécification des cellules germinales est médiée par la région spécifique visuellement distincte du cytoplasme de l'ovocyte qui contient les facteurs maternels comme VASA. C'est un modèle de préformation. Selon le deuxième modèle, dit « inductif » utilisé chez les mammifères, la ségrégation de la lignée germinale n'est pas liée avec une spécification d'une région du cytoplasme maternel, mais les cellules germinales apparaissent en tant que cellules germinales primordiales en dehors des lignées somatiques durant le développement précoce sous l'influence des signaux extraembryonnaires (West&Daley 2004). Il a longtemps été admis que la lignée germinale du poulet se spécifiait selon le modèle inductif de l'épiblaste au stade X (Swift 1914). Le traçage des origines de la lignée germinale à l'aide de l'anticorps contre chicken vasa homolog (CVH) (Tsunekawa et al. 2000) a changé la vision de cette spécification. L'observation de CVH en immunohistochimie au cours du développement précoce suggère que chez le poulet les cellules germinales pourraient se développer selon le premier modèle (Tsunekawa *et al.* 2000). Chez le poulet la protéine CVH est présente dans une région spécifique du cytoplasme de l'ovocyte mature formant une structure globulaire et qui est colocalisée avec le nuage mitochondrial comme chez le xenope. Au cours des divisions du zygote, la protéine CVH est toujours détectée dans quelques cellules, qui peuvent être considérées comme progéniteurs des cellules germinales. Au stade blastoderme (stade X (Eyal-Giladi&Kochav 1976)) l'embryon est à 24h après fécondation et correspond à l'œuf pondu. Il compte ~30 cellules positives pour CVH qui sont également positives aux antigènes SSEA-1 et EMA-1 après la dispersion des cellules du blastoderme en culture, et sont considérées à partir de ce stade comme CGPs. Au stade 4 HH

(Hamburger&Hamilton 1951) les cellules CGPs présumées forment une structure extraembryonnaire croissant germinal autour de l'extrémité antérieure de la ligne primitive. Avec la formation du réseau sanguin et de l'aorte dorsale les CGPs rentrent dans la circulation sanguine et circulent entre les stades 14-17 HH (18-19h d'incubation) avant de migrer dans les gonades (52-64 h d'incubation). A ce stade on compte ~200 CGPs. Après la migration dans les gonades elles deviennent les CGPs gonadiques (gonocytes) ; elle se multiplient et se différencient en spermatogonies (stade 39, jour13 d'incubation) chez les mâles génétiques et ne reprennent les divisions que 10 semaines après l'éclosion. Chez les femelle les CGPs gonadiques se multiplient et se différencient dans les ovocytes primaires dans l'ovaire gauche au stade 34 (8 jours d'incubation) et commencent les premières méioses vers le stade 39 (13 jours d'incubation) (Nakamura *et al.* 2013a).

Les CPGs peuvent être prélevées à 4 stades décrits ci-dessus (STADE X Eyal-Giladi&Kochav correspondant respectivement au stade blastoderme, au stade 4-5 HH correspondant au croissant germinal, au stade des CGPs circulantes vers 14-17 HH et au stade des CGPs gonadiques) et utilisées pour la production des chimères germinales par transplantation dans l'embryon receveur souvent au stade blastoderme ou circulatoire. Cependant les chimères germinales ainsi obtenues sont rares vu le petit nombre de CGPs par rapport au nombre total de cellules embryonnaires ou sanguines selon le stade. Pour exemple, au stade blastoderme l'embryon compte 30000-50000 cellules et seulement ~30 CGPs (Tsunekawa *et al.* 2000).

Les cellules de blastoderme dans la culture de longue durée appelées cellules souches embryonnaires (ES pour embryonic stem cells) perdent leur qualités germinales évaluées par l'expression des marqueurs SSEA-1 et EMA-1 (Pain *et al.* 1996), mais peuvent être reprogrammées en CGPs capables de coloniser les gonades de l'embryon receveur après surexpression dans ces cellules de CVH (Lavial*, et al.* 2009). Le développement de cultures permanentes de CGPs prélevées aux stades du croissant germinal ou au stade circulatoire a permis d'amplifier ces cellules d'une manière illimitée en gardant jusqu'à certaines limites leurs qualités germinales (van de Lavoir *et al.* 2006a) La culture de CGPs aviaires est classiquement réalisée sur un tapis de cellules nourricière STO (des fibroblastes embryonnaire de souris) ou BRL (buffalo rat liver) dans un milieu KO DMEM (INVITROGEN) contenant un milieu conditionné BRL, supplémenté par le serum fœtal bovin et le sérum du poulet, les facteurs de croissances SCF et bFGFB, donc un milieu chimiquement peu défini. FGFB a été identifié comme un facteur essentiel et suffisant dans ces conditions de culture pour le maintien et la prolifération des CGPs en culture (Choi*, et al.* 2010; Macdonald*, et al.* 2010). Cependant ce milieu convient pour dériver les CGPs des mâles génétiques, tandis que l'obtention des cultures des CGPs femelles est beaucoup plus rare. Les cellules femelles se dédifférencient plus rapidement en culture que celles des mâles (Song *et al.* 2014; van de Lavoir *et al.* 2006a). Les CGPs du poulet prélevées de l'aorte dorsale et dérivées en culture ne peuvent pas se développer en gamètes fonctionnels dans le sexe opposé (Macdonald *et al.* 2010) contrairement aux CGPs de souris dérivées en culture (Kocer*, et al.* 2009). Il est

intéressant de noter que les CGPs prélevées au stade blastoderme se développent en gamètes fonctionnels après le transfert dans l'embryon receveur du même stade mais du sexe opposé. Dans ces chimères les CGPs mâles peuvent se développer en ovocytes fonctionnels et les CGPs femelles en spermatozoïdes Z mais pas en spermatozoïdes W-fonctionnels (Kagami*, et al.* 1997). Il est possible que les CGPs durant la culture ou entre les deux stades du développement (stade blastoderme et circulatoire) subissent des modifications épigénétiques limitant leur plasticité sexuelle.

D'une manière générale le taux de transmission germinale après transplantation des CGPs maintenues en culture de longue durée dans les embryons receveurs est très variable et souvent n'est pas satisfaisant. Il peut dépendre de la compétition des CGPs donneurs et receveurs, de la nature de la lignée des embryons receveurs, de la durée des cultures (Nakamura *et al.* 2013a). Plusieurs tentatives ont été entreprises pour limiter la compétition des CGPs donneurs avec les CGPs receveurs en utilisant l'irradiation et les agents chimiques (busulfan) pour détruire les CGPs des blastodermes receveurs. Mais ces méthodes entrainent une mortalité embryonnaire considérable ou ne sont pas assez efficaces ou mises au point. Il a été démontré récemment que même si les CGPs sont détruites par busulfan au stade de blastoderme elles sont restaurées vers le milieu de la période embryonnaires (Lee H.C. 2013). Une tentative a été entreprise récemment avec succès de coloniser les gonades des hybrides stériles entre le poulet et le faisan avec les CGPs du poulet après culture, mais les expériences se limitaient au développement embryonnaire (Kang*, et al.* 2011) .

Malgré le progrès indéniable qui a été réalisé lors de ces dernières années dans la manipulation des CGPs et les connaissances acquises sur leur développement, beaucoup de questions concernant la biologie et le fonctionnement des CGPs ainsi que les aspects de leur interaction avec les cellules somatiques de la gonade restent à explorer pour pouvoir maitriser leur culture et leur transmission et comprendre l'évolution des mécanismes impliqués dans leur développement dans le règne animale. Certaines de ces questions sont adressées dans mon projet de recherche.

Etude du rôle des BMPs et de l'Acivines dans la différenciation des PGCs aviaires.

Les cellules positives pour CVH dans l'embryon très précoce sont considérées comme progéniteurs des CGPs. A partir du stade X les cellules de blastoderme positives pour CVH sont considérées comme CGPs, qui apparaissent au stade X, mais ne peuvent pas garder en culture *in vitro* leur compétences germinales (Pain *et al.* 1996), contrairement aux CGPs prélevées à des stades ultérieurs (4-6 ou 14-15 HH) (Nakamura*, et al.* 2013b). Ces observations suggèrent qu'entre le stade X et le stade 4-6 HH des signaux inconnus induisent des modifications épigénétiques des cellules CVH et SSEA-1 positives et donc la différenciation des CGPs. A la différences des cellules ES, qui après injection dans un embryon receveur, peuvent contribuer uniquement aux tissus somatiques (van de Lavoir&Mather-Love 2006), les CGPs ne contribuent qu'à la lignée germinale sauf si elles étaient différenciées dans les conditions particulières de culture en « embryonic germ cells » (EGs) qui peuvent contribuer uniquement aux tissus somatiques (van de Lavoir*, et al.* 2006b). De même comme

décrit dans la brève revue présentée ci-dessus la plasticité sexuelle des CGPs diminue entre le stade X et le stade 4-6 HH. Des facteurs et des mécanismes qu'ils induisent sur la voie de différenciation des CGPs et les maintiennent dans l'état différencié après le stade X sont donc indispensables à connaître pour maitriser la culture et la transmission efficace des CGPs. Récemment une collaboration avec M. McGrew de Roslin Institute (Edinburgh) nous a permis de développer les cultures permanentes des CGPs mâles et femelles prélevées à partir de l'aorte dorsale de l'embryon au stade 14-15, et cultivées en absence des cellules nourricières et de sérum du veau fœtal (SVF) dans un milieu spéciale « aviaire » conçu par M. McGrew ou dans un milieu DMEM adapté au niveau de l'osmolarité, la concentration du calcium et du glucose. Le facteur indispensable pour la survie et la prolifération des CGPs en absence des cellules nourricières et de SVF en plus de FGFb serait l'Activine A. En utilisant ces milieux nous avons pu dériver les cultures des CGPs circulantes mais nous avons remarqué que dans un milieu DMEM adapté l'Activine A recombinante humaine (rhAct) ne permettait pas les cultures de longue durée des CGPs femelles. Au cours de la différenciation les sous-unités des activines sont très préférentiellement exprimées dans les testicules et les BMPs dans les ovaires (Carre *et al.* 2011). Ces facteurs pourraient être différentiellement impliqués dans la différenciation des CGPs mâles et femelles. Par ailleurs chez la souris la signalisation par Bmp4 sécrétée par l'ectoderme extraembryonnaire et Wnt3/β-catenine déclenche la spécification de CGPs dans l'épiblaste postérieur par l'activation d'un facteur transcriptomique mesodermique très conservé T, qui à son tour active les gènes essentiels Blimp1 et Prdm14, qui activent le programme du remodelage épigénétique ; BMP4 jouant également un rôle important et essentiel dans la répression du programme génétique du développement du mésoderme (Aramaki, et al. 2013; Ohinata, et al. 2009; Ohinata, et al. 2005). La signalisation de BMP4 pourrait être également impliquée dans le développement des CGPs aviaires. En se basant sur ces hypothèses, nous avons réalisé les cultures des CGPs en présence de l'Activine et de BMP4. Nous avons pu constater au bout de 1-2 mois de culture que les CGPs femelles avait une préférence plus ou moins marquée pour la BMP4 selon le milieu utilisé (milieu aviaire ou DMEM adapté) tandis que les CGPs mâles soit avaient une préférence pour rhAct soit dérivaientt aussi bien en présence de l'un et de l'autre. Des millions de CGPs mâles et femelles ont été ainsi obtenus à partir d' échantillons individuels au bout de 5-8 semaines de cultures. Ces CGPs étaient positives aux colorations PAS, CVH, SSEA-1. Cependant les voies moléculaires régulées par rhAct et BMP4 dans les CGPs aviaires restent méconnues. Chez la souris les ESCs (embryonic stem cells) sont induits en EpiLCs (epiblaste-like cells) de pré-gastrulala par l'Activine A et le FGFB ; les EpiLCs peuvent ensuite être induites par BMP4 en PGC-like cells (PGCLCs) (Hayashi*, et al.* 2012; Hayashi*, et al.* 2011). Chez le poulet les cellules ESc dérivées du blastoderme dispersées et génétiquement modifiées pour exprimer CVH acquièrent au moins certaines qualités germinales : elles commencent à exprimer DAZL, un autre gène spécifique des CGPs, et colonisent les gonades après le transfert dans l'embryon receveur, ce qui suggère que CVH est un facteur essentiel qui oriente les cellules ESc vers la différenciation en CGPs. CVH est exprimé au niveau de la protéine et du transcrit des les premières

divisions zygotiques et durant tout le développement inrautérin (Elis*, et al.* 2008; Tsunekawa *et al.* 2000). Son expression à ces stades serait maternelle. 24h après fécondation, au stade blastoderme quand l'activation du génome démarre, on observe une augmentation importante de l'expression de CVH (Elis *et al.* 2008). Il est possible qu'à ce stade un signal inconnu soit nécessaire pour le démarrage et le maintien de l'expression de CVH par le génome embryonnaire. Ce signal pourrait impliquer l'Activine et/ou BMP4 et la voie activée par BMP4 impliquant WNT3, T, BlIMP1 et PRDM14 pourrait au moins en partie être conservée chez le poulet. Dans ce contexte il serait intéressant de déterminer les cibles positivement et négativement régulées de l'activine et de BMP4 des CGPs des mâles et des femelles en culture. Dans un premier temps, nous allons étudier l'activation de la voie SMAD 1/5/8 par BMP4 et de SMAD2 par Activine, ainsi que des récepteurs BMPR1A, BMPR1B, BMPRII, ACTRIA, ACTRIIA. Nous allons également voir si les gènes Wnt3, T, BLIMP1 et PRDM14, TFAP2C sont exprimés dans les CGPs en culture et si c'est le cas, regarder si leur expression persiste quand la voie de BMP est inhibée. L'effet de supplémentation de la culture par Wnt3a sous condition d'inhibition de BMP4 d'une part et l'inhibition de la voie WNT en présence ou en absence/ inhibition de BMP4 d'autre part sur l'expression des cibles potentiels T, BLIMP1, PRDM14, SOX2, FOXA2, les gènes de la famille Hox et les déméthylase DNMT1,2,3 ainsi que CVH permettront d'évaluer la conservation de cette voie chez le poulet et de mieux comprendre le rôle de l'Activine A et BMP4 dans le maintien et la prolifération des CGPs en culture. Dans un deuxième temps l'immunoprecipitation de la chromatine avec un anticorps contre SMAD suivi d'un séquençage des sites de liaison (ChipSeq) pourra être envisagée pour déterminer les cibles directes de la signalisation de BMP4 et de l'Activine. Ces études pourraient être complétées par l'analyse transcriptomique (RNASEQ). La culture des cellules de blastoderme devra être envisagée dans le milieu aviaire en présence de BMP4 ou d'Activine A pour voir si ces facteurs permettent de maintenir l'expression des marqueurs des CGPs dans les cultures de longue durée et de promouvoir leur survie et leur prolifération et peut-être de dériver les CGPs en culture à partir de ce stade. En plus de l'intérêt fondamental de ces expériences, pouvoir dériver les CGPs en culture à partir des cellules de blastoderme a un véritable intérêt finalisé dans un contexte de conservation des ressources génétiques. La cryopréservation des blastodermes, si leur amplification en culture est maitrisée après congélation, est économiquement beaucoup plus intéressante, que la cryoconservation des CGPs après culture de longue durée qui est très couteuse. Il serait également intéressant de tester d'autre TGFβ comme BMP2 et Activine B sur le comportement des CGPs en culture.

Le role des BMPs et des Activines sur les CGPs gonadiques (gonocytes) sera étudié en utilisant la culture organotypique que nous avons établie dans nos travaux précédents. La culture des gonades sera réalisée en présence de ces molécules ou de leurs inhibiteurs suivie par l'analyse du nombre de CGPS et de l'expression de leurs marqueurs.

L'ensemble de ces travaux devront apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des CGPs mâles et femelles chez le poulet et de permettre mieux maitriser leurs cultures et donc la conservation des patrimoines génétiques. Ils sont développés en étroite collaboration dans l'équipe avec E. Blesbois, IR, S. ALVES, TR et V. Guérin IE contractuelle recrutée dans le cadre du projet région VALBIODI consacré au développement des outils de conservation des races locales à petit effectif ; B. Pain, PrimaStem, INSERM de Lyon. Notre race modèle ici est la poule Noire du Berry.

Les facteurs impliqués dans l'identité sexuelle phénotypiques des CGPs

Les CGPs mâles ou femelles prélevées plus tardivement que le stade X et dérivées en culture ne peuvent pas se développer en gamètes fonctionnels et sont souvent perdues au cours du développement postnatal après transfert dans les embryons du sexe opposé (Macdonald *et al.* 2010; Park&Han 2013; Song *et al.* 2014), ce qui suggère que très tôt ces cellules acquièrent leur prédétermination du développement sexuel. Les facteurs moléculaires impliqués dans cette différenciation ne sont pas connus. Un des objectifs des projets dans lesquels je suis impliquée (CRB ANIM et VALBIODI) consiste à identifier les différences entre les CGPs mâles et femelles dérivées en culture. En collaboration avec E. Blesbois, L. Vasco, postdoctorante dans le cadre du projet CRB-ANIM, spécialiste des approches protéomiques, et aussi avec V. Guérin et S. Alves, le protéome des CGPs mâles et femelles dérivées *in vitro* sera analysé en premier temps par l'approche Maldi-Tof (protéines et peptides 2-25000 daltons) couplée à une identification top down comme récemment utilisé avec succès dans notre équipe pour une étude du protéome du spermatozoïde (Labas*, et al.* 2014). En cas de nécessité cette approche pourra être complétée par une approche Bottum up, cependant beaucoup plus lourde à mettre en œuvre. D'après mes connaissances, ces approches n'ont encore pas été appliquées à l'étude des CGPs. Les premières mises au point sont déjà réalisées et la signature du protéome/peptidome des CPGs est obtenue. Nous espérons obtenir les signatures des CGPs mâles et femelles et peut-être les modifications posttraductionnelles différentielles des histones. Cette étude sera ultérieurement complétée par une étude transcriptomique. L'ensemble de ces études doit nous aider à comprendre le verrouillage de la plasticité sexuelle des CGPs et à donner des clés pour éventuellement pouvoir la déprogrammer ce qui pourrait être très intéressant pour les biotechnologies de conservation des ressources génétique basées sur les CGPs.

Impact de la cryopreservation des cultures de longue durée sur la qualité et des CGPs.

Au cours des différentes étapes des biotechnologies de conservation de cellules à potentiel reproducteur se pose une question fondamentale la qualité des cellules en termes de 1) compétence à transmettre le génome et l'épigénome non altérés à la descendance et 2) capacité à donner une descendance viable et d'une manière efficace. Cependant rien n'est connu à l'heure actuelle sur l'impact de la cryopréservation et de la culture sur la qualité de CGPs, sous le terme qualité on

comprend l'intégrité du génome, de l'épigénome, du transcriptome, du protéome et du lipidome. Les cultures de longue durée (au-delà de 5-8 semaine) affectent d'une manière drastique la transmission de CGPs après le transfert à la descendance, même si ces cellules expriment toujours les marqueurs spécifiques comme CVH, SSEA-1, EMA-1 et sont PAS positives. A travers les projets actuels (CRB ANIM) et le projet européen IMAGE en préparation nous nous intéresserons à l'impact de la durée de culture et de la cryopréservation sur l'évolution du protéome et du transcriptome des CGPs. L'approche protéomique est utilisée actuellement avec succès et pour la première fois dans notre équipe pour évaluer l'impact de la cryopréservation sur la qualité de la semence et pour rechercher les marqueurs de qualité de la semence (résultats non encore publiés). Cette approche très prochainement sera appliquée aux CGPs cryopréservés. Dans le cadre de l'ANR international Cryobirds nous avons déjà effectué une étude préliminaire sur l'impact de la cryopreservation (on comprend sous le terme cryopréservation les étapes de congélation, décongélation et de l'élimination des cryoprotécteurs par lavage) des blastodermes avec une perspective de pouvoir un jour dériver les CGPs à partir des blastodermes cryopréservés. Nous avons réalisé ce travail en collaboration avec B. Pain (INRA, Primastem, INSERM de Lyon) qui nous a fourni une liste de gènes candidats sélectionnés par l'approche transcriptomique pour être exprimés dans le blastoderme en tant que gènes pluripotents et germinaux. Ce travail a été réalisé en collaboration avec E. Blesbois, S. Alves et I. Grasseau, TR, ainsi que V. Guérin. Comme mentionné ci-dessus le stade blastoderme contient 30-50 CGPs sur 30000-50000 cellules de blastoderme. Dans cette étude nous avons pu constater une dégradation globale des transcrits de tous les gènes après la décongélation par rapport aux cellules de blastoderme frais, cependant les niveaux de transcrits variaientt d'une manière très différente selon le gène. Les gènes connus pour être impliqués dans le développement de la lignée germinale mâle chez la souris (NODAL, ACTVR2) sont parmi les gènes les plus touchés. Nous allons poursuivre en utilisant des cultures de CGPs analysées par une approche restreinte de gènes-candidat par PCR en Temps réel, puis l'approche protéomique, puis l'approche transcriptomique plus large. Concernant les cultures de longue durée des CGPs nous supposons que leur perte de compétence au développement dans l'embryon receveur est due en grande partie aux modifications épigénétiques incorrectes de ces cellules qui seraient en cause dans l'instabilité de leur génome. Nous allons aborder ce problème par l'approche protéomique en collaboration avec L. Vasco et V. Labas IR de la plateforme protéomique et transcriptomique en parallèle avec l'équipe de M. McGrew, Roslin Institute qui lui étudiera l'instabilité du génome des CGPs en culture par les approches de séquençage dans le cadre du projet européen en préparation s'il est accepté. Ces études nous permettront d'identifier les facteurs responsables de l'altération des CGPs à différentes étapes du procédé de leur conservation et de mettre le doigt sur les mécanismes essentiels qui leur confèrent leur compétence germinale. Elles ouvriront également les voies pour optimiser les cultures et les protocoles de cryopréservation des CGPs.

Contexte gonadique et transmission germinale des CGPs.

La variabilité des taux de transmission germinale après le transfert des CGPs dans un embryon receveur est un véritable problème dans les biotechnologies de restauration des patrimoines génétiques aviaires utilisant les CGPs. Comme préalablement mentionné, la compétition des CGPs du donneur avec les CGPs du receveur dans la gonade semble y être une des premières causes. Nous envisageons d'explorer plusieurs voies pour augmenter les chances des CGPs donneurs de se développer dans les gonades de l'embryon receveur. Ces voies seront développées dans les projets européens IMAGE et ANR international GermDuck tous les deux en préparation. Le but est de stériliser les embryons receveurs tout en préservant les capacités de transmission germinale des CGPs des donneurs. Plusieurs voies de stérilisation seront explorées : stérilisation par modification génétique des CPGs du receveur ; traitement chimique ou radiation UV seront abordés en collaboration avec l'équipe du Roslin Institute. Je me suis intéressée dans ce contexte aux oiseaux hybrides inter-espèces tels les canards-mulard (hybride de canard de Barbarie et de cane Pékin), les hybrides poulet-caille ou poulet-faisans. Ces oiseaux sont stériles la plupart de temps, en particulier les femelles ont des gonades mal développées contenant ou pas des cellules germinales arrêtant leur développement à des stades en général précoces. Les causes de stérilité ne sont pas connues, mais pourraient être liées à l'incompatibilité des chromosomes lors de leur appariement pendant la méiose. Chez les femelles, la méiose ayant lieu durant le développement embryonnaire, le développement gonadique est très vite affecté après la naissance. Notre hypothèse ici est que si les embryons-hybrides recevaient les CGPs d'un individu d'une des espèces parentales, ces CGPs pourraient promouvoir le développement des gonades hybrides et être préférentiellement développés par rapport aux CGPs hybrides. De plus si les CGPs donneurs ici peuvent se développer en gamètes fonctionnels on pourrait espérer 100% de transmission en cas de succès du transfert. Les premières recherches dans ce domaine sont prometteuses (Kang *et al.* 2011). Sur le plan fondamental, une comparaison du développement des gonades hybrides en absence ou en présence des CGPs « normales » parentales constituent un modèle très intéressant pour identifier les facteurs germinaux impliqués dans le développement gonadique mais aussi pour explorer comment l'environnement gonadique peut influencer le développement des cellules germinales.

Les cultures des CGPs aviaires *in vitro* comme modèle d'avenir pour l'écotoxicologie.

Dans la synthèse de mes travaux j'ai brièvement présenté mon implication dans le projet sur les perturbateurs endocriniens STORM où j'ai développé en collaboration avec Edith Guibert, AI contractuel et P. Froment, CR1 de mon équipe un modèle sensible pour évaluer l'impact des perturbateurs endocriniens sur le développement du système reproducteur chez l'oiseau basé sur la culture organotypique. Une des causes supposées des cancers testiculaires d'origine germinale est une exposition pré- et périnatale aux perturbateurs endocriniens qui peuvent affecter directement ou indirectement le développement des cellules germinales (Rajpert-De Meyts 2007; Rajpert-de Meyts&Hoei-Hansen 2007). Les perturbateurs endocriniens rejetés dans les milieux sont également

mis en cause dans la diminution voire la disparition de certaines populations d'oiseaux sauvages à cause de problèmes de reproduction. La culture immortalisée de CGPs aviaires congelables, obtenue d'une manière non-invasive par rapport à la mère, représenterait un excellent outil pour évaluer l'effet direct des perturbateurs endocriniens sur les différents aspects du fonctionnement de ces cellules et pourrait donc servir de modèle pour un test toxicologique. Ce thème n'est pas au cœur de mes projets immédiats mais j'envisage de me rapprocher de nouveau des recherches dans ce domaine et de proposer un projet en toxicologie en utilisant la culture de CGPs aviaires comme modèle et outil. L'amélioration de notre connaissance des mécanismes impliqués dans le développement des CGPs proposée dans les chapitres précédents nous permettra de proposer les voies moléculaires à évaluer comme cibles des perturbateurs endocriniens. La recherche de nouvelles cibles de perturbateurs endocriniens pourra être envisagée par des approches transcriptomiques, protéomiques et epigénétiques.

CONCLUSIONS

La biologie des cellules germinales primordiales *aviaire in vitro ou in vivo* dans la gonade et est un champ vaste pour les recherches fondamentales et finalisées. Les perspectives que j'ai présentées sont larges et visent aussi bien l'acquisition des connaissances dans ce domaine que le développement des outils pour les biotechnologies de reproduction et conservation des ressources génétiques. Je les aborderai dans l'ordre des priorités, dictées par l'état du développement des outils et des connaissances et les objectives des projets en cours (Valbiodi et CRB ANIM) Ces priorités sont les suivantes :

1) La mise en place de la culture de longue durée des CGPs mâles et femelle, qui est un outil incontournable pour la recherche et les biotechnologies. Cette partie est aujourd'hui largement acquise au laboratoire. Il nous reste à mettre en place les tests fonctionnels basés sur le transfert des CGPs après culture dans l'embryon receveur et l'évaluation de la colonisation des gonades par ces cellules, et plus loin sur la présence des gamètes fonctionnels issus des CGPs donneurs et la transmission du matériel génétique à la descendance.

2) La caractérisation des voies moléculaires impliquées dans le maintien et la prolifération des CGPs mâles et femelles en culture activées par les BMPs et l'Activine et de l'action de ces molécules sur les CGPs gonadiques me semble indispensable de point de vue fondamental et finalisé. Ce travail commence dans le cadre du stage M2 de M. Cherif-Feildel et un projet de thèse pour l'année 2015 est déjà déposé.

3) La caractérisation de l'identité sexuelle phénotypique des CGPs est également commencée par les approches protéomiques et sera poursuivie par des approches transcriptomiques. Cette étude nous apportera une connaissance sur les spécificités du développement des CGPs aviaires et doit permettre mieux maitriser leur manipulation lors des biotechnologies de conservation/restoration des ressorces génétiques.

4) L'évaluation de la qualité des CGPs cryopréservées et après culture de longue durée est une étape importante pour le succès de leur développement dans l'organisme receveur et pour pouvoir prédire la qualité de la descendance. Ce travail a commencé déjà sur les cellules de blastoderme cryopréservées et sera poursuivi sur les CGPs lors du stage M2 de W. Resiné et en collaboration avec L .Vasko (posdoc agreenskills dans notre équipe)

5) A plus long terme l'interaction des CGPs et des cellules somatiques gonadiques sera étudiée en explorant des modèles d'hybrides inter-espèces stériles et en utilisant la culture des CGPs. L'exploration de ces modèles me semble une opportunité originale pour comprendre l'influence des CGPs sur le développement de la gonade et pour pouvoir améliorer le taux des gamètes issus de CGPs donneurs.

6) Les CGPs in vitro pourront être abordées à terme dans un contexte d'écotoxicologie de la reproduction puisque la culture de ces cellules présente un modèle pertinent pour la recherche dans ce domaine pouvant aller jusqu'au développement d'un test.

7) L'étude de nouveaux gènes identifiés comme impliqués dans la différenciation gonadique, en particulier des gènes liés aux chromosomes sexuels dans un contexte comparé est un sujet que j'envisage de développer en étroite collaboration avec S. Fouchécourt, CR1 qui a rejoint notre équipe en 2010 et qui s'intéresse à l'évolution des gènes de reproduction.

Dans le développement des différentes parties du projet je m'appuierai sur des collaborations nationales et internationales. L'ensemble de ce projet permettra d'améliorer notre connaissance de la biologie des CGPs aviaires *in vitro* et *in vivo* et de développer de nouvelles biotechnologies de reproduction utiles pour la conservation et la valorisation des ressources génétique.

LISTE DE PUBLICATION

Articles

1- **Govorun MS**, Osipova TA, Khil'ko SN, Martynov AV, Bulatov AA. An electrophoretic analysis of human glycoprotein hormones and their subunits.Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki. ***1992***;(7),74-80.

2-Zakharenko VI, Nenashev AV, **Govorun MS**, Komissarova LV, Aleshkin GI, Skavronskaia AG. Construction
and analysis of the tularemia pathogen gene library in Escherichia coli]. Mol Gen Mikrobiol Virusol. ***1990***, 22-5.

3- **Govoroun, M.S.**, Huet, J.C., Pernollet, J.C., Breton, B. Use of immobilized metal ion affinity chromatography and dye-ligand chromatography for the separation and purification of rainbow trout pituitary gonadotropins, GTH I and GTH II. Journal of Chromatography B, ***1997***, 698, 35-46.

4- Breton, B., Sambroni, E., **Govoroun, M.**, Weil, C. Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout Oncorhynchus mykiss. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série 3, ***1997***, 320, 783-789.

5- Breton, B., **Govoroun, M.**, Mikolajczyk, T.GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: Relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. General and Comparative Endocrinology, ***1998***, 111, 38-50.

6- **Govoroun, M.**, Chyb, J., Breton, B Immunological cross-reactivity between rainbow trout GTH I and GTH II and their alpha and beta subunits: Application to the development of specific radioimmunoassays.General and Comparative Endocrinology, ***1998***, 111, 28-37.

7- Saligaut, C., Linard, B., Mananos, E.L., Kah, O., Breton, B., **Govoroun, M.** Release of pituitary gonadotrophins GtH I and GtH II in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Modulation of estradiol and catecholamines
General and Comparative Endocrinology, ***1998***, 109, 302-309.

8- Bon, E., Breton, B., **Govoroun, M.**S., Le Menn, F.Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout : II seasonal variations of plasma gonadotropins (GTHI and GTHII) levels correlated with ovarian follicle growth and egg size.Fish Physiology and Biochemistry, ***1999***, 20, 143-154.

9- Marchand, O., **Govoroun, M.**, d'Cotta, H., McMeel, O., Lareyre, J.J., Bernot, A., Laudet, V., Guiguen, Y.

DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss.
Biochimica et Biophysica Acta, ***2000***, 1493, 180-187.

10- Liu, S., **Govoroun, M.**, d'Cotta, H., Ricordel, M.J., Lareyre, J.J., McMeel, O.M., Smith, T., Nagahama, Y., Guiguen, Y.Expression of cytochrome P450 11B (11beta-hydrolase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, ***2000***, 75, 291-298.

11- **Govoroun, M.**, McMeel, O.M., d'Cotta, H., Ricordel, M.J., Smith, T., Fostier, A., Guiguen, Y. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in Rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Experimental Zoology**,** ***2001***, 290, 558-566.

12- **Govoroun, M.**, McMeel, O.M., Mecherouki, H., Smith, T.J., Guiguen, Y.17 B-estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis. Endocrinology, ***2001***, 142, 1841-1848

13- d'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., **Govoroun, M.**, Baroiller, J.F.Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, Oreochromis niloticus. Journal of Experimental Zoology, ***2001***, 290, 574-585.

14- D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., **Govoroun, M.**, Baroiller, J.F. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia Oreochromis niloticus. Molecular Reproduction and Development, ***2001***, 59, 265-276.

15- Batellier, F., **Govoroun, M.**, Brillard, J.P. Sex-ratio chez les oiseaux sauvages et domestiques. Productions Animales, ***2004***, 17, 365-372.

16- **Govoroun, M.S**., Pannetier, M., Pailhoux, E., Coquet, J., Brillard, J.P., Couty, I., Battelier, F., Cotinot, C.
Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. Developmental Dynamics, ***2004***, 231, 859-870.

17- **Govoroun, M.**, Le Gac, F., Guiguen, Y.Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. BMC Genomics, ***2006***, 7, 1-8.

18- 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. Journal of Endocrinology, ***2007***, 194, 485-497.

19- Elis, S., Batellier, F., Couty, I., Balzergue, S., Martin-Magniette, M.-L., Monget, P., Blesbois, E., **Govoroun, M.** Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen. BMC Genomics, ***2008***, 9, 110, 1-20.

20- Elis, S., Blesbois, E., Couty, I., Balzergue, S., Martin-Magniette, M.-L., Batellier, F., **Govoroun, M.** Identification of germinal disk region derived genes potentially involved in hen fertility. Molecular Reproduction and Development, ***2009***, 76, 1043-1055.

21- Carré G.-A., Couty, I., Hennequet-Antier, C., **Govoroun**. Gene expression profiling reveals new potential players of gonad differentiation in the chicken embryo. Carre, M. Plos One, ***2011***, 6, 12 p. / e23959.

22- Blesbois, E, M **Govoroun,** A Hidas, K Liptói, B Pain, F Seigneurin, E Patakiné-Várkonyi, J Barna**.** 2012. Development of avian reproductive biotechnologies for the

management of genetic diversity: CRYOBIRDS. Worlds Poultry Science Journal 68: pp. 285-288.

Brevet

23-Brillard, J.P., Tréfil, P., **Govoroun**, **M.** 20-Transfer of spermatogonia in avian species (FRA) : INPI ***2004***. n.p.
Brevet 04292573.5;04292573.5,

Chapitres d'ouvrages

24-Batellier F, Brillard JP, **Govoroun M**, 2005. L'anatomie et la physiologie de l'appareil genital femelle chez les oiseaux. *In* : Reproduction des animaux d'élevage, Chapitre 14 ; 342-357. Educagri Editions (2nde Edition)

25- Batellier F **Govoroun M**, 2005. De la fécondation à l'éclosion de l'œuf chez les oiseaux. *In* : Reproduction des animaux d'élevage, Chapitre 16 ; 370-385. Educagri Editions (2nde Edition)

Communications avec actes

26-Khillo,S.N. **Govoroun M,** Kirasova,M.A. Kuznetsov,A.A. Goncharov, B.F. Pituitary gonadotropic hormone from a chondrostean fish, starred sturgeon *Acipencer stellatus Pall,* P201 [Résumé] in Proceedings of 15th conference of European Comparative Endocrinologists, ***1990*** Leuven (BE).

27-**Govoroun M.S**. Goncharov B.F., Burzawa-Gerard E., Breton B., Le Menn F. The purification and characterization of gonadotropin representing the biologically active dimer of two GTH α subunits from pituitaries of sturgeon (Acipencer stellatus). p.481 [Résumé] in Proceedings of 6thInternational Symposium on Reproductive Physiology of Fish,July 4-9 1999,Bergen, Norway.

28-D'Cotta,H, GuigenY, **Govoroun,M,** McMeel,O.M. and Baroiller J.F. Aromatase gene expression in tempreture-induced gonadal sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. P.244-246 [Résumé] in Procedings of 6thInternational Symposium on Reproductive Physiology of Fish,July 4-9 ***1999***, Bergen, Norway.

29-GuigenY, **Govoroun,M,** D'Cotta,H, McMeel,O.M. Fostier.A. Steroids and gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Présentation orale. p.241-243 [Résumé] in Procedings of 6thInternational Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 4-9 ***1999***, Bergen, Norway.

30-**Govoroun, M,** D'Cotta, H, Baroiller J.F, Ricordel, M.J. McMeel,O.M. Smith,T. Fostier, A and GuigenY,(2000). Expression of steroid enzyme genes during natural and steroid-induced gonadal sex differentiation in teleost fish. Présentation orale. P.5 [Résumé] in Procedings of 2ndInternational Symposium in the biology of Sex Determination, April 10-14, ***2000***, Honolulu, Hawaii.

31-**Govoroun,M,** Marchand.O. D'Cotta,H, McMeel,O.M. Bernot,A. Laudet. V. and Guigen.Y(2000). Dmrt1 involvement in rainbow trout testis differentiation. Présentation orale. p.19 [Résumé] in Procedings of 2ndInternational Symposium in the biology of Sex Determination, April 10-14, ***2000***, Honolulu, Hawaii.

32-D'Cotta,H, Fostier, A GuigenY, **Govoroun,M,** Baroiller J.F. (2000) Search for the molecular mechanisms implicated in the thermosensitivy of sex gonadal differentiation of tilapia fish: differential approach and expression of candidate genes. Présentation orale. P.14-15 [Résumé] in

Procedings of 2nd International Symposium in the biology of Sex Determination, April 10-14, ***2000***, Honolulu, Hawaii.

33- Hérault, F., Le Meuth-Metzinger, V., Désert, C., Retout, E., Piumi, F., **Govoroun, M.**, Duclos, M., Douaire, M.
Premiers résultats du programme agenae concernant la génomique fonctionnelle de la poule ***2003***. 6 p. [Article]. In : Comptes Rendus. 5. Journées de la Recherche Avicole (2003-03-26-2003-03-27) Tours (FRA)

34- Assaf, S., Bourneuf, E., Cabello, G., Chardon, P., Dehais, P., Diot, C., Douaire, M., Duclos, M.J., Gautron, J., **Govoroun, M.**, Herault, F., Klopp, C., Le Bihan-Duval, E., Lagarrigue, S., Nys, Y., Piumi, F., Retout, E. Analyse du transcriptome de poule (Gallus) ; profil d'expression des ARNm de différents tissus et analyse du métabolisme des lipides.***2003***. [Article]. In : Colloque Génomique des animaux d'élevage, Seignosse-le-Penon. Colloque Génomique des animaux d'élevage, Seignosse-le-Penon (2003-05-19-2003-05-21) Seignosse-le-Peignon (INC)

35- Aegerter, S., Baron, D., Carpentier, C., Chauvigné, F., Dantec, C., Estampes, A., Goupil, A.-S., Jumel, A., Jutel, I., Mazurais, D., Melaine, N., Montfort, J., Bobe, J., Chardon, P., Chevalet, C., Fauconneau, B., Fostier, A., **Govoroun, M.**, Le Cam, A., Le Gac, F., Klopp, C., Panserat, S., Piumi, F., Rallière, C., Rescan, P.-Y., Guiguen, Y. The INRA AGENAE program and the Agenae trout EST collections: first results applied to fish physiology research. (USA) : Elsevier (Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology, 137, 3), ***2004***. S137 [Résumé]. In : Abstracts of the annual main meeting of the society for experimental biology. Experimental Biology Annual Main Meeting (2004-03-29-2004-04-02) Edinburgh (GBR)

36- **Govoroun, M.**, Pannetier, M., Tourlet, S., Pailhoux, E., Brillard, J.-P., Cotinot, C. L'homologue du gène FOXL2 chez le poulet. L'étude comparative des profils d'expression des gènes CFOXL2 et aromatase dans les gonades d'embryons de poulet après l'inversion sexuelle induite par un inhibiteur d'aromatase ou l'oestradiol. ***2004***. 16. [Résumé]. In : 5 ème Atelier Déterminisme et Différenciation du Sexe. 5. Atelier Déterminisme et Différenciation du Sexe (2004-09-09-2004-09-10) Nancy (FRA)

37- **Govoroun, M.**, Pannetier, M., Pailhoux, E., Couty, I., Brillard, J.-P., Batellier, F., Cotinot, C. Further bservations on the roles of FOXL2 in ovarian differentiation and function in the chicken. (GBR) : Science Reviews (Avian and Poultry Biology Reviews, 15, 3-4), ***2004.*** 224 [Article]. In : Proceedings of Fundamental physiology and perinal development in poultry . Adaptation in poultry: the impact of environment. Fundamental physiology and perinal development in poultry . Adaptation in poultry: the impact of environment (2003-10-09-2003-10-11) Berlin (DEU)

38- Elis, S., **Govoroun, M.**, Monget, P., Couty, I., Brillard, J.-P., Blesbois, E., Batellier, F.Compétence ovocytaire chez la poule. Paris (FRA) : INRA Editions (Journées de la Recherche Avicole, 7), ***2007***. 394-398 [Article]. In : Proceedings des 7èmes Journées de la Recherche Avicole. 7. Journées de la Recherche Avicole (2007-03-28-2007-03-29) Tours (FRA)

39- **Govoroun, M.**, Carré, G.-A., Couty, I., Brillard, J.-P.Gene expression profiling during gonadal differentiation in chicken. Présentation orale. Oxford (GBR) : Blackwell Publishing (Integrative Zoology, Special Issue,). ***2008***. p:33 [Résumé]. In : Proceedings of the XX International Congress of Zoology. 20. International Congress of Zoology (2008-08-26-2008-08-29) Paris (FRA)

40- Carré G.-A., 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., Volff, J.-N., Desvignes, T., Guiguen, Y., Mourot, B., Yano, A., Fostier, A. Implication des membres de la super famille des TGF bêta dans la différenciation gonadique chez les vertébrés. Présentation

orale. ***2008***. 43. [Résumé]. In : Journées de Restitution des Projets financés sur Crédits Incitatifs en 2006 et 2007- Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage. Journées de Restitution des Projets financés sur Crédits Incitatifs en 2006 et 2007 - Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage (2008-11-26-2008-11-27) Tours (FRA)

41-Elis, S., **Govoroun, M.**, Monget, P., Couty, I., Blesbois, E., Batellier, F. Hen oocyte specificity and genes expression during early embryo development ***2007***. 1 p. [Présentation orale]. [Résumé] Conference on Reproductive and Developmental Biology (2007-06-21-2007-06-22) Prague (CZE)

42-Carre, G., Fabre, S., Couty, I., Brillard, J.P., **Govoroun, M.** BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein): new actor during the gonadal development in the chicken embryo? Présentation orale. ***2009***.p.85 [Résumé] , Fifth International Symposium on Vertebrate Sex Determination. 20-24 April 2009, Kona, Hawaii

43- Elis, S., Blesbois, E., Dupont, J., Monget, P., Couty, I., Balzergue, S., Martin-Magniette, M.-L., Batellier, F., **Govoroun, M.** Transcriptomic approach to study oocyte competence in the hen. Présentation orale. Tours (FRA) : French Branch of World's Poultry Science Association (World's Poultry Science Journal, 66, S), ***2010***. p:152 [Article]. In : Proceedings of the 13th European Poultry Conference (EPC 2010). 13. European Poultry Conference (EPC 2010) (2010-08-23-2010-08-27) Tours (FRA)

44- Froment, P., **Govoroun, M.**, Guibert, E., Prieur, B., Brillard, J.P Développement d'outils de diagnostic en reprotoxicologie aviaire.Paris (FRA) : ITAVI (Journées de la Recherche Avicole, 9), ***2011***. 196-196 [Article]. In : 9èmes Journées de la Recherche Avicole. 9. Journées de la Recherche Avicole (2011-03-29-2011-03-30) Tours (FRA)

45- Froment, P., **Govoroun, M.**, Guibert, E., Prieur, B., Brillard, J.-P. Développement d'outils d'aide à l'analyse en reprotoxicologie - Utilisation d'un modèle sensible : l'oiseau. Issy-les-Moulineaux (FRA) : Elsevier Masson SAS Éditeur (Annales d'Endocrinologie, 72, 5), ***2011***. 424-425[Résumé]. In : Proceedings du 28ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE). 28. Congrès de la Société Française d'Endocrinologie (2011-10-10-2011-10-13) Clermont-Ferrand (FRA)

46-Govoroun M., Pain B., Seigneurin F., Blesbois E. French National Platform for Management of Avian biodiversity. Development of Tools through Cryopreservation of Blastodermal and Primordial Germ Cells, **2013:** 66 [résumé]. In Proceeding du International Forum on Avian Germplasm, Seoul, Korea (2013-10-25-28)

<u>Communications sans actes</u>

47- **Govoroun, M.**, Goupil, A.-S., Le Gac, F., Guiguen, Y.Bilan du séquençage d'une collection de « gènes exprimés » chez la truite arc-en-ciel Oncorhynchus mykiss.***2004***. 1 p.[Résumé]. 1. Journée de présentation des projets AGENAE (2004-03-17-2004-03-18) Montpellier (FRA)

48- Bonnet, A., Degrelle, S., Désert, C., Douaire, M., **Govoroun, M.**, Goupil, A.-S., Guiguen, Y., Hatey, F., Hérault, F., Hocquette, J.-F., Hue, I., Le Gac, F., Le Provost, F., Le Meuth-Metzinger, V., Martin, P., Pollet, S., Renard, J. P., Sandra, O., Sudre, S., Tosser-Klopp, G.Bilan du séquençage de collections d'ADNc chez 4 espèces d'élevage (bovin, porc, poule, truite)(programmes ASTEROGER et AGENAE). ***2004***. 2 p. [Résumé]. Séminaire INRA Séquençage : programmes de génomique (2004-12-02-2004-12-03) Paris (FRA)

49- Bonnet, A., Degrelle, S., Desert, C., Douaire, M., **Govoroun, M.**, Goupil, A.S., Guiguen, Y., Hatey, F., Herault, F., Hocquette, J.F., Hue, I., Le Gac, F., Le Provost, F., Lemeuth-Metzinger, V., Martin, P., Pollet, S., Renard, J.P., Sandra, O., Sudre, K., Tosser-Klopp, G.Bilan du séquençage de collections de gènes exprimés des animaux d'élevage.***2004***. [Résumé]. Séminaire INRA Séquencage : programmes de génomique.

50- Bonnet, A., Degrelle, S., Diot, C., Douaire, M., **Govoroun, M.**, Goupil, A.-S., Guiguen, Y., Hatey, F., Hérault, F., Hocquette, J.-F., Hue, I., Lagarrigue, S., Le Gac, F., Leroux, C., Martin, P., Pollet, S., Renard, J. P., Sandra, O., Tosser-Klopp, G.Réseaux d'ADNc pour l'analyse du transcriptome des animaux d'élevage ***2004***. 2 p. [Résumé]. Séminaire INRA Séquençage : programmes de génomique (2004-12-02-2004-12-03) Paris (FRA)

51- Carré G.-A., Couty, I., Hennequet-Antier, C., **Govoroun MS**. Gene expression profiling reveals new potential players of gonad differentiation in the chicken embryo. Présentation orale. Les Journées d'Animation Scientifique du Département PHASE. (2012-31-01-01-02). Rennes (FRA)

REFERENCE

Aegerter S, Jalabert B & Bobe J 2005 Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol Reprod Dev* **72** 377-385.

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

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

Alizadeh Z, Kageyama S & Aoki F 2005 Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol Reprod Dev* **72** 281-290.

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

Ayers KL, Smith CA & Lambeth LS 2013 The molecular genetics of avian sex determination and its manipulation. *Genesis* **51** 325-336.

Bai XH, Wang DW, Luan Y, Yu XP & Liu CJ 2009 Regulation of chondrocyte differentiation by ADAMTS-12 metalloproteinase depends on its enzymatic activity. *Cell Mol Life Sci* **66** 667-680.

Barbato GF 1999 Genetic relationships between selection for growth and reproductive effectiveness. *Poult Sci* **78** 444-452.

Baron D, Houlgatte R, Fostier A & Guiguen Y 2005 Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod* **73** 959-966.

Baron D, Montfort J, Houlgatte R, Fostier A & Guiguen Y 2007 Androgen-induced masculinization in rainbow trout results in a marked dysregulation of early gonadal gene expression profiles. *BMC Genomics* **8** 357.

Batellier F, Couty I, Olszanska B, Stepinska U & Brillard JP 2003 In vitro fertilisation of chicken oocytes after in vitro ovulation. *Br Poult Sci* **44** 819-820.

Berg C, Holm L, Brandt I & Brunstrom B 2001 Anatomical and histological changes in the oviducts of Japanese quail, Coturnix japonica, after embryonic exposure to ethynyloestradiol. *Reproduction* **121** 155-165.

Bettegowda A & Smith GW 2007 Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. *Front Biosci* **12** 3713-3726.

Brake J 1998 Equipment design for breeding flocks. *Poult Sci* **77** 1833-1841.

Briata P, Van De Werken R, Airoldi I, Ilengo C, Di Blas E, Boncinelli E & Corte G 1995 Transcriptional repression by the human homeobox protein EVX1 in transfected mammalian cells. *J Biol Chem* **270** 27695-27701.
Brillard JP 2004 Natural mating in broiler breeders : Present and future concerns. . *Word Poult Sci J* **60** 439-445.
Buanne P, Corrente G, Micheli L, Palena A, Lavia P, Spadafora C, Lakshmana MK, Rinaldi A, Banfi S, Quarto M, et al. 2000 Cloning of PC3B, a novel member of the PC3/BTG/TOB family of growth inhibitory genes, highly expressed in the olfactory epithelium. *Genomics* **68** 253-263.
Carre GA, Couty I, Hennequet-Antier C & Govoroun MS 2011 Gene expression profiling reveals new potential players of gonad differentiation in the chicken embryo. *PLoS One* **6** e23959.
Choi JW, Kim S, Kim TM, Kim YM, Seo HW, Park TS, Jeong JW, Song G & Han JY 2010 Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS One* **5** e12968.
Clark DA, Ding JW, Chaouat G, Coulam CB, August C & Levy GA 1999 The emerging role of immunoregulation of fibrinogen-related procoagulant Fgl2 in the success or spontaneous abortion of early pregnancy in mice and humans. *Am J Reprod Immunol* **42** 37-43.
Clayton GA 1972 Effects of selection on reproduction in avian species. *J Reprod Fertil Suppl* **15** 1-21.
Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, et al. 2001 The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* **27** 159-166.
Dade S, Callebaut I, Mermillod P & Monget P 2003 Identification of a new expanding family of genes characterized by atypical LRR domains. Localization of a cluster preferentially expressed in oocyte. *FEBS Lett* **555** 533-538.
Dade S, Callebaut I, Paillisson A, Bontoux M, Dalbies-Tran R & Monget P 2004 In silico identification and structural features of six new genes similar to MATER specifically expressed in the oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* **324** 547-553.
Davidson EH 1986 *Gene Activity in Early Development*. Florida: Academic press.
De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F & Berta P 1998 Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* **18** 6653-6665.
Dooley CA, Attia GR, Rainey WE, Moore DR & Carr BR 2000 Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production. *J Clin Endocrinol Metab* **85** 3331-3337.
Elbrecht A & Smith RG 1992 Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* **255** 467-470.
Elis S, Batellier F, Couty I, Balzergue S, Martin-Magniette ML, Monget P, Blesbois E & Govoroun MS 2008 Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen. *BMC Genomics* **9** 110.
Elis S, Dupont J, Couty I, Persani L, Govoroun M, Blesbois E, Batellier F & Monget P 2007 Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary. *J Endocrinol* **194** 485-497.
Etches RJ & Petitte JN 1990 Reptilian and avian follicular hierarchies: models for the study of ovarian development. *J Exp Zool Suppl* **4** 112-122.
Eusebe D, di Clemente N, Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N & Picard JY 1996 Cloning and expression of the chick anti-Mullerian hormone gene. *J Biol Chem* **271** 4798-4804.
Extavour CG & Akam M 2003 Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* **130** 5869-5884.

Eyal-Giladi H & Kochav S 1976 From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev Biol* **49** 321-337.
Fujimoto T, Ukeshima A & Kiyofuji R 1976 The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *Anat Rec* **185** 139-145.
Glister C, Kemp CF & Knight PG 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** 239-254.
Gomez Y, Velazquez PN, Peralta-Delgado I, Mendez MC, Vilchis F, Juarez-Oropeza MA & Pedernera E 2001 Follicle-stimulating hormone regulates steroidogenic enzymes in cultured cells of the chick embryo ovary. *Gen Comp Endocrinol* **121** 305-315.
Guioli S & 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** 4199-4208.
Haccard O & Jessus C 2006 Oocyte maturation, Mos and cyclins--a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. *Cell Cycle* **5** 1152-1159.
Hamburger V & Hamilton HL 1951 A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **88** 49-92.
Hammerstedt RH 1999 Symposium summary and challenges for the future. *Poultry science* **78** 459-466.
Hanna-Rose W & Hansen U 1996 Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet* **12** 229-234.
Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H & Saitou M 2012 Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* **338** 971-975.
Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S & Saitou M 2011 Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* **146** 519-532.
He B, Mi Y & Zhang C 2013 Gonadotropins regulate ovarian germ cell mitosis/meiosis decision in the embryonic chicken. *Mol Cell Endocrinol* **370** 32-41.
Hellani A, Ji J, Mauduit C, Deschildre C, Tabone E & Benahmed M 2000 Developmental and hormonal regulation of the expression of oligodendrocyte-specific protein/claudin 11 in mouse testis. *Endocrinology* **141** 3012-3019.
Hoshino A, Koide M, Ono T & 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** 65-74.
Inoue D, Ohe M, Kanemori Y, Nobui T & Sagata N 2007 A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of Xenopus laevis eggs. *Nature* **446** 1100-1104.
Ishimaru Y, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Toyama Y, Maekawa M, Toshimori K, Chandraratna RA, Morohashi K, et al. 2008 Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development* **135** 677-685.
Jaleel M, McBride A, Lizcano JM, Deak M, Toth R, Morrice NA & Alessi DR 2005 Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS Lett* **579** 1417-1423.
Johnson AL, Woods, C. 2007 *Ovarian Dynamics and Follicle Development*. Australia: Science Publishers.
Jordanov J & Angelova P 1984 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* **24** 221-233.
Kagami H, Tagami T, Matsubara Y, Harumi T, Hanada H, Maruyama K, Sakurai M, Kuwana T & Naito M 1997 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** 501-510.
Kain KH, Miller JW, Jones-Paris CR, Thomason RT, Lewis JD, Bader DM, Barnett JV & Zijlstra A 2014 The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev Dyn* **243** 216-228.
Kalantaridou SN, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Godoy H & Chrousos GP 2007 The role of corticotropin-releasing hormone in blastocyst implantation and early fetal immunotolerance. *Horm Metab Res* **39** 474-477.
Kamata R, Takahashi S, Shimizu A, Morita M & Shiraishi F 2006 In ovo exposure quail assay for risk assessment of endocrine disrupting chemicals. *Arch Toxicol* **80** 857-867.
Kang SJ, Sohn SH, Kang KS, Lee HC, Lee SK, Choi JW & Han JY 2011 Molecular and biological aspects of early germ cell development in interspecies hybrids between chickens and pheasants. *Theriogenology* **75** 696-706.
Karagenc L, Cinnamon Y, Ginsburg M & Petitte JN 1996 Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev Genet* **19** 290-301.
Katoh H, Ogino Y & Yamada G 2006 Cloning and expression analysis of androgen receptor gene in chicken embryogenesis. *FEBS Lett* **580** 1607-1615.
Kezele P & Skinner MK 2003 Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* **144** 3329-3337.
Knight PG & Glister C 2006 TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* **132** 191-206.
Kocer A, Reichmann J, Best D & Adams IR 2009 Germ cell sex determination in mammals. *Mol Hum Reprod* **15** 205-213.
Labas V, Grasseau I, Cahier K, Gargaros A, Harichaux G, Teixeira-Gomes AP, Alves S, Bourin M, Gerard N & Blesbois E 2014 Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen. *J Proteomics*.
Lambeth LS, Cummins DM, Doran TJ, Sinclair AH & Smith CA 2013 Overexpression of aromatase alone is sufficient for ovarian development in genetically male chicken embryos. *PLoS One* **8** e68362.
Lambeth LS, Ohnesorg T, Cummins DM, Sinclair AH & Smith CA 2014 Development of retroviral vectors for tissue-restricted expression in chicken embryonic gonads. *PLoS One* **9** e101811.
Lasko P 2013 The DEAD-box helicase Vasa: evidence for a multiplicity of functions in RNA processes and developmental biology. *Biochim Biophys Acta* **1829** 810-816.
Lavial F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J & Pain B 2009 Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Dev Biol* **330** 73-82.
Le Bouffant R, Guerquin MJ, Duquenne C, Frydman N, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Frydman R, Habert R & Livera G 2010 Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Hum Reprod* **25** 2579-2590.
Lee H.C. KSK, Park T.S., Rengaraj D., Park K.J., Lee, H.J., Park S.B., Kim S.W., Choi S.B., Han J.Y. 2013 Compensatory proliferartion of endogenous chicken primordial germ cells after elimination by busulphan treatment. *Stem Cell Research & Therapy* **4**.
Livera G, Delbes G, Pairault C, Rouiller-Fabre V & Habert R 2006 Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* **324** 507-521.
Lu Y, West FD, Jordan BJ, Jordan ET, West RC, Yu P, He Y, Barrios MA, Zhu Z, Petitte JN, et al. 2014 Induced pluripotency in chicken embryonic fibroblast results in a germ cell fate. *Stem Cells Dev* **23** 1755-1764.

Lu Y, West FD, Jordan BJ, Mumaw JL, Jordan ET, Gallegos-Cardenas A, Beckstead RB & Stice SL 2012 Avian-induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells Dev* **21** 394-403.
Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarras P, Kumar TR, Dutertre M, Matzuk MM, Picard JY, Josso N & Rey R 2003 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* **17** 550-561.
Macdonald J, Glover JD, Taylor L, Sang HM & McGrew MJ 2010 Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS One* **5** e15518.
Malewska A & Olszanska B 1999 Accumulation and localisation of maternal RNA in oocytes of Japanese quail. *Zygote* **7** 51-59.
Maurer P, T'Sas F, Coutte L, Callens N, Brenner C, Van Lint C, de Launoit Y & Baert JL 2003 FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanine-rich domain. *Oncogene* **22** 3319-3329.
Mazaud-Guittot S, Meugnier E, Pesenti S, Wu X, Vidal H, Gow A & Le Magueresse-Battistoni B 2010 Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biol Reprod* **82** 202-213.
McDowall S, Argentaro A, Ranganathan S, Weller P, Mertin S, Mansour S, Tolmie J & Harley V 1999 Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J Biol Chem* **274** 24023-24030.
McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, et al. 2005 Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction* **129** 481-487.
Mendez-Herrera MC, Tamez L, Candido A, Reyes-Esparza JA & Pedernera E 1998 Follicle stimulating hormone increases somatic and germ cell number in the ovary during chick embryo development. *Gen Comp Endocrinol* **111** 207-215.
Meyer DB 1960 Application of periodic acid-Shiff technique to whole chick embryos. *Stain Technol* **35** 83-89.
Mitchell PG, Pledger WJ & Cheung HS 1989 Molecular mechanism of basic calcium phosphate crystal-induced mitogenesis. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* **264** 14071-14077.
Moore A, Krummen LA & Mather JP 1994 Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol* **100** 81-86.
Morisson M, Bordas A, Petit JM, Jayat-Vignoles C, Julien R & Minvielle F 1997 Associated effects of divergent selection for residual feed consumption on reproduction, sperm characteristics, and mitochondria of spermatozoa. *Poult Sci* **76** 425-431.
Mortlock DP, Sateesh P & Innis JW 2000 Evolution of N-terminal sequences of the vertebrate HOXA13 protein. *Mamm Genome* **11** 151-158.
Moumne L, Dipietromaria A, Batista F, Kocer A, Fellous M, Pailhoux E & Veitia RA 2008 Differential aggregation and functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription factor involved in cranio-facial and ovarian development. *Hum Mol Genet* **17** 1010-1019.
Muir WM, Wong GK, Zhang Y, Wang J, Groenen MA, Crooijmans RP, Megens HJ, Zhang H, Okimoto R, Vereijken A, et al. 2008 Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** 17312-17317.

Nakamura Y, Kagami H & Tagami T 2013a Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Dev Growth Differ* **55** 20-40.
Nakamura Y, Tasai M, Takeda K, Nirasawa K & Tagami T 2013b Production of functional gametes from cryopreserved primordial germ cells of the Japanese quail. *J Reprod Dev* **59** 580-587.
Naz RK & Rajesh C 2005 Gene knockouts that cause female infertility: search for novel contraceptive targets. *Front Biosci* **10** 2447-2459.
Nieuwkoop PD, Faber, J. 1956 1956 *Normal table of Xenopus laevis*. Amsterdam North-Holland, Publ. Co.: North-Holland, Publ. Co.
Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D & Magre S 1998 Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn* **212** 522-532.
Otsuka F, Moore RK & Shimasaki S 2001a Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem* **276** 32889-32895.
Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF & Shimasaki S 2001b Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* **276** 11387-11392.
Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF & Shimasaki S 2000 Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* **275** 39523-39528.
Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Servel N, Taourit S, Furet JP, Fellous M, Grosclaude F, Cribiu EP, Cotinot C, et al. 2001 A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet* **29** 453-458.
Pailhoux E, Vigier B, Vaiman D, Servel N, Chaffaux S, Cribiu EP & Cotinot C 2002 Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Dev Dyn* **224** 39-50.
Paillisson A, Dade S, Callebaut I, Bontoux M, Dalbies-Tran R, Vaiman D & Monget P 2005 Identification, characterization and metagenome analysis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome. *BMC Genomics* **6** 76.
Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J & Etches RJ 1996 Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* **122** 2339-2348.
Park TS & Han JY 2013 Conservation of migration and differentiation circuits in primordial germ cells between avian species. *J Reprod Dev* **59** 252-257.
Pedernera E, Solis L, Peralta I & Velazquez PN 1999 Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development. *Gen Comp Endocrinol* **116** 213-220.
Pellegrini M, Grimaldi P, Rossi P, Geremia R & Dolci S 2003 Developmental expression of BMP4/ALK3/SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: a potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *J Cell Sci* **116** 3363-3372.
Pennetier S, Perreau C, Uzbekova S, Thelie A, Delaleu B, Mermillod P & Dalbies-Tran R 2006 MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC Dev Biol* **6** 26.
Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Mandon-Pepin B, Monniaux D, Monget P & Fabre S 2004 Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *J Mol Endocrinol* **33** 805-817.
Porter S, Clark IM, Kevorkian L & Edwards DR 2005 The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* **386** 15-27.
Puglisi R, Montanari M, Chiarella P, Stefanini M & Boitani C 2004 Regulatory role of BMP2 and BMP7 in spermatogonia and Sertoli cell proliferation in the immature mouse. *Eur J Endocrinol* **151** 511-520.

Rajpert-De Meyts E 2007 Recent advances and future directions in research on testicular germ cell cancer. *Int J Androl* **30** 192-197.
Rajpert-de Meyts E & Hoei-Hansen CE 2007 From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann N Y Acad Sci* **1120** 168-180.
Reddish JM, Nestor KE & Lilburn MS 2003 Effect of selection for growth on onset of sexual maturity in randombred and growth-selected lines of Japanese quail. *Poult Sci* **82** 187-191.
Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL & Josso N 1993 Anti-mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* **77** 1220-1226.
Robinson JA & Buhr MM 2005 Impact of genetic selection on management of boar replacement. *Theriogenology* **63** 668-678.
Rombauts L, Berghman LR, Vanmontfort D, Decuypere E & 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** 549-554.
Ross A, Munger S & Capel B 2007 Bmp7 regulates germ cell proliferation in mouse fetal gonads. *Sex Dev* **1** 127-137.
Sauka-Spengler T & Barembaum M 2008 Gain- and loss-of-function approaches in the chick embryo. *Methods Cell Biol* **87** 237-256.
Sauveur B 1988 *Reproduction des volailles et producion des oeufs*. Paris : Imprimerie Durand S. A.
Scheib D 1983 Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* **23 Suppl** S87-92.
Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, Ornitz DM & Capel B 2004 Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* **131** 3627-3636.
Schmidt M, Oskarsson MK, Dunn JK, Blair DG, Hughes S, Propst F & Vande Woude GF 1988 Chicken homolog of the mos proto-oncogene. *Mol Cell Biol* **8** 923-929.
Silversides FG, Robertson MC & Liu J 2013 Cryoconservation of avian gonads in Canada. *Poult Sci* **92** 2613-2617.
Smith CA, McClive PJ, Hudson Q & Sinclair AH 2005 Male-specific cell migration into the developing gonad is a conserved process involving PDGF signalling. *Dev Biol* **284** 337-350.
Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ & Sinclair AH 2009 The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* **461** 267-271.
Song Y, Duraisamy S, Ali J, Kizhakkayil J, Jacob VD, Mohammed MA, Eltigani MA, Amisetty S, Shukla MK, Etches RJ, et al. 2014 Characteristics of long-term cultures of avian primordial germ cells and gonocytes. *Biol Reprod* **90** 15.
Souza CJ, Campbell BK, McNeilly AS & Baird DT 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** 363-369.
Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM & Eppig JJ 2004 Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol* **276** 64-73.
Swift CH 1914 Origin and early history of the primordial germ-cells of the chick. . *Am. J. Anat.* 483-516.
Takada S, Mano H & Koopman P 2005 Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads. *Cell Mol Life Sci* **62** 2140-2146.

Teng CT, Teng CS, Bousfield GR, Liu WK & Ward DN 1982 Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen Comp Endocrinol* **48** 325-332.
Tian T & Meng AM 2006 Nodal signals pattern vertebrate embryos. *Cell Mol Life Sci* **63** 672-685.
Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T & Noce T 2000 Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* **127** 2741-2750.
Uzbekova S, Roy-Sabau M, Dalbies-Tran R, Perreau C, Papillier P, Mompart F, Thelie A, Pennetier S, Cognie J, Cadoret V, et al. 2006 Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of different transcript variants in male and female germ cells. *Reprod Biol Endocrinol* **4** 12.
Vaillant S, Guemene D, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N & Brillard JP 2003 Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (Gallus domesticus) treated with Fadrozole. *Mol Reprod Dev* **65** 420-428.
Vallee M, Gravel C, Palin MF, Reghenas H, Stothard P, Wishart DS & Sirard MA 2005 Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. *Biol Reprod* **73** 63-71.
van de Lavoir MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, et al. 2006a Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* **441** 766-769.
van de Lavoir MC & Mather-Love C 2006 Avian embryonic stem cells. *Methods Enzymol* **418** 38-64.
van de Lavoir MC, Mather-Love C, Leighton P, Diamond JH, Heyer BS, Roberts R, Zhu L, Winters-Digiacinto P, Kerchner A, Gessaro T, et al. 2006b High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells. *Mech Dev* **123** 31-41.
Velazquez PN, Peralta I & Pedernera E 1997 Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* **105** 40-49.
Vizziano-Cantonnet D, Baron D, Mahe S, Cauty C, Fostier A & Guiguen Y 2008 Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *J Mol Endocrinol* **41** 277-288.
Wassarman PM, Jovine L & Litscher ES 2004 Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res* **105** 228-234.
West JA & Daley GQ 2004 In vitro gametogenesis from embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **16** 688-692.
Woods J, Hopkins W, Caliendo J, Sorentino M, Martens J & Thommes R 1985 Ontogenesis of LHRH in the hypothalamus and LH and FSH in the pars distalis of the chick embryo. In *Current Trends in Comparative Endocrinology*, pp 131-134. Eds Lofts & E Holmes. Hong Kong: Hong Kong Univ.Press.
Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL & Matzuk MM 2003 Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* **33** 187-191.
Xu H, Li M, Gui J & Hong Y 2007 Cloning and expression of medaka dazl during embryogenesis and gametogenesis. *Gene Expr Patterns* **7** 332-338.
Yamamoto T 1969 *Sex differentiation. Fish Physiology*: Academic Press New York.
Ye X, Marks HL, Nestor KE, Bacon WL & Velleman SG 1999 Genetic relationship among lines and smooth muscle and ovarian follicular development within lines of Japanese quail in two long-term selection studies. *Poult Sci* **78** 1372-1376.
Young J, Rey R, Schaison G & Chanson P 2003 Hypogonadotropic hypogonadism as a model of post-natal testicular anti-Mullerian hormone secretion in humans. *Mol Cell Endocrinol* **211** 51-54.

Yu P, Lu Y, Jordan BJ, Liu Y, Yang JY, Hutcheson JM, Ethridge CL, Mumaw JL, Kinder HA, Beckstead RB, et al. 2014 Nonviral minicircle generation of induced pluripotent stem cells compatible with production of chimeric chickens. *Cell Reprogram* **16** 366-378.
Yue J & Ferrell JE, Jr. 2006 Mechanistic studies of the mitotic activation of Mos. *Mol Cell Biol* **26** 5300-5309.
Zagris N, Kalantzis K & Guialis A 1998 Activation of embryonic genome in chick. *Zygote* **6** 227-231.

CURRICULUM VITAE

GOVOROUN Marina
Née le 14.05.1964 à Moscou
Nationalité : Russe
Divorcée, un enfant

Adresse personnelle 66, rue Jolivet
37000 Tours
tel : 0247387740
tel : 0661863069

Adresse professionnelle INRA-PRC, centre de Tours
37380 Nouzilly
tel : 0247427548
fax :0247427778

FORMATION

1981-1988: Etudes supérieures à l'Institut de Médecine de Pirogov de Moscou, Russie.
Le stage pour l'obtention du Diplôme de fin d'études a été effectué à l'Institut de Recherche en Virologie et Bactériologie de Gamaley et à l'Institut de Recherche en Biotechnologie Médicale de Moscou. ″Analyse de la banque génomique de l'agent causal de la tularemie dans *Echerichia coli*. » Directeurs: Dr Zacharenko et Dr Durmanov N.D. Défendu avec mention très bien.

1988-1990: Thèse de Doctorat

Laboratoire de génétique moléculaire et de génie génétique des micro-organismes dirigé par Pr. T. Tichonenko, Institut National de Biotechnologie Agricole de Russie ″Analyse comparée des propriétés biochimiques et immunochimiques des hormones glycoprotéiques chez certains vertébrés″, directeur Dr. S.N. Khilko.

DIPLOMES

1988 : Diplôme de médecin biochimiste. L'Institut de Médecine de Pirogov de Moscou, Russie

1994 : Diplôme du docteur en biologie. Institut National des Recherches en Biotechnologie Agricole de Russie

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

1990-1993 : Chercheur post-doctoral au Laboratoire de Physiologie des Poissons, INRA, Rennes, France.

1993-1995 : Chercheur à l'Institut National de Biotechnologie Agricole de Russie, Moscou, Russie.

1995-1996 : Chercheur contractuel sur contrat européen au Laboratoire de Physiologie des Poissons, l'INRA, Rennes, France.

1996-1997 : Chercheur à l'Institut National de Biotechnologie Agricole de Russie, Moscou, Russie.

1997-1998 : Chercheur associé au Laboratoire de Biologie de la Reproduction des Poissons, Université de Bordeaux I.

1998-2001 : Chercheur contractuel, INRA, SCRIBE, Rennes, France.

2001 : Chargé de Recherche de Première classe stagiaire

2002 -présent : Chargé de Recherche de Première classe titulaire

FORMATION COMPLEMENTAIRES

2002, 6 jours : « De l'exploitation bioinformatique des données génomiques fonctionnelles à l'analyse dynamique des réseaux moléculaires. » Atelier INSERM, ESIL, Campus de Luminy, Marseille.

2003 1 jour : Utilisation d'analyseur « Agilent »

2004, 3 jours : Formation « Etudiant-stagiaire », INRA

2005, 2 jours : Formation « Ecriture », INRA, Lille

2008 : 4 jours « Analyse bioinformatique des séquences », INRA de Tours

2005, 10 jours : « Expérimentation Animale », Lycée agricole de Vendôme, INRA de Tours

2007 : 2 jours « L'analyse statistique de microarray »

2009 : 3jours « Utilisation de Genomatix », INRA de Tours

RESPONSABILITES

Depuis 2010 Animatrice d'équipe « Testicule Ontogénèse Métabolisme » de l'UMR PRC puis de2013 jusqu' à présent de l'équipe « Gonade, Conservation, Génération **».**
Depuis 2014 Animatrice du groupe « Volaille » dans le projet Infrastructure CRB ANIM

PARTICIPATION A L'ENSEIGNEMENT

Depuis 2004 cours dans le cadre du MASTER 2 « Reproduction »

ECADREMENT DE PERSONNES

Personnels :
I. Couty, T.R. 2001-2013
V. Guillory, T.R., 2009
S. Alves, T.R., 2011-présent
E. Guibert T.R., 2010-2013
P. Solnais, A.J.T, 2009-présent
W. Guérin IE : 2013-présent

Etudiants
4 Etudiants de M1, 1 étudiant de M2, 1apprentit d'IUT, 3 étudiants en thèse.

PARTICIPATION A LA VIE DU COLLECTIF

Membre du conceil de service de l'UMR PRC, 2 mandat

PARTICIPATION AUX JURY DE THESE

D. Baron, Université de Rennes 1, 2005
S. Poonlaphdecha, Université de Montpellier 2 2012
E. Marvin, 2014
C. Ouedraogo,2014

EXPERTISE SCIENTIFIQUE

Expertise scientifique pour les revues scientifiques: Mechanisms of Development, Gene Expression Patern, General and Comparative Endocrinology, Journal of Chromatography, Journal of Experimental zoology, P, Sexual Development, Human Molecular Genetic; Theriogenology, Molecular Reproduction and Development, PlosOne
Pour les organismes: ANR, Wageningen Institute of Animal Science, National Science Foundation (USA).

LISTE DES ACTIVITES D'ENCADREMENT DES ETUDIANTS

Année	Nom établissement	Nature de Stage	Titre du travail
2003	**P. Duprix** IUT d'Aurillac	Stage de Seconde Année	Implication du gène FOXL2 dans la différenciation des ovaires du Poulet
2006	**M. Provost** Université F. Rabelais , Tours	Master 1	Etude de la famille des TGFβ dans la différenciation gonadique chez le poulet . Approches in vitro et in vivo
2007	**C. Gallet** Université F. Rabelais , Tours	Master 1	Etude de l'action des membres de la famille des BMP/TGFβ sur la différenciation des gonades chez l'embryon de poulet.
2007	**L.-h Touazi** Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, Université Paris IX	Master2	L'étude de l'action des inhibiteurs d'aromatase non stéroïdiens et stéroïdiens et des androgènes non aromatisables sur la différenciation ovarienne chez le poulet
2008	**L. Yart** Université F. Rabelais , Tours	Master1	Growth and body composition betwen hatching and maturity in sex reversed chickens
2012	**C. Bongibault** Université F. Rabelais , Tours	Master1	L'étude de la fonction du gène cFOXL2 chez le poulet
2003-2005	**S. Tourlet** Université F. Rabelais , Tours	Thèse J-P Brillard/HDR	Identification des gènes impliqué dans la différenciation gonadique chez le poulet
2004-2007	**S. Elis** Université F. Rabelais , Tours	Thèse E. Blesbois/HDR	Approche transcriptomique de la compétence ovocytaire chez la poule
2007-2010	**G. Carré** Université F. Rabelais , Tours	Thèse J-P Brillard/HDR	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)

PARTICIPATION A DES CONTRATS DE RECHERCHE

Type de contrats	DATES	Intitulé	Montant €	Implication
Credit Incitatif PHASE INRA	2005, 2007-2008	Système BMP, nouvel acteur de la différenciation gonadique ? Analyse comparée	8000	Responsable partenaire 2
Contrat avec Intervet	2006-2007	confidentiel	16000	Responsable INRA
Contrat avec Intervet	2007-2008	confidentiel	24000	Responsable INRA
Projet International INRA-RFBR (Russie)	2009-2010	Functional study of transcription factor Foxl2 during chicken ovarian development *in vitro* using adenoviral gene delivery.	30000 pour le partenaire français	Responsable partenaire français
Projet INERIS	2010-2013	STORM Spesific Tools and Methods for Reprotoxicity	150000	Responsable PRC P. Froment Responsable d'une tache
ANR Internatinal	2010-2014	Cryobirds Biotechnologies de la reproduction aviaire au service de gestion de la divérsité génétique	223000 pour UMR PRC	Coordinateur du projet E. Blesbois Responsable d'une tache
Projet Infrastructure	2013-2021	CRB ANIM Centre des ressources biologiques animales	2100000 Pour UMR PRC	Coordinateur PRC E. Blesbois Participation dans un WP
Projet région	2012-2015	Valbiodi Conservation et valorisation des races locales	200000 Pour UMR PRC	Coordinateur PRC E. Blesbois Participation dans un WP