HAL
open science

Rôle de DMRT1 dans la détermination du sexe et la fertilité – Analyse du phénotype de lapins DMRT1 KO

Emilie Dujardin

To cite this version:

Emilie Dujardin. Rôle de DMRT1 dans la détermination du sexe et la fertilité – Analyse du phénotype de lapins DMRT1 KO. Biologie de la reproduction. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL134 . tel-04357468

HAL Id: tel-04357468

https://hal.inrae.fr/tel-04357468

Submitted on 24 Jan 2024

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.

université PARIS-SACLAY

Rôle de DMRT1 dans la détermination du sexe et la fertilité – Analyse du phénotype de lapins DMRT1 KO

Role of DMRT1 in determining sex and fertility – Phenotypic analyses of DMRT1 KO rabbits

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568 : signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté de Médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **BREED (Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE)** sous la direction de **Eric PAILHOUX**, directeur de recherche, le co-encadrement de **Maëlle PANNETIER**, chargée de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 19 décembre 2023, par

Emilie DUJARDIN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Virginie ROUILLER-FABRE Professeure des universités, Université Paris-Saclay	Présidente
Marie-Christine CHABOISSIER Directrice de recherche, Université Côte d'Azur	Rapporteur & Examinatrice
Serge NEF Professeur, Université de Genève	Rapporteur & Examinateur
Hélène BOURAÏMA-LELONG Maitresse de conférences, HDR, Université de Caen Normandie	Examinatrice

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2023UPASL134

ÉCOLE DOCTORALE
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)

université PARIS-SACLAY

Titre : Rôle de DMRT1 dans la détermination du sexe et la fertilité – Analyse du phénotype de lapins DMRT1 KO.

Mots clés : Détermination du sexe, Gonades, Fertilité, Cellules de Sertoli, Cellules germinales

Résumé : DMRT1 est considéré comme le facteur déterminant du testicule chez de nombreux vertébrés. Découvert chez la drosophile et le ver *Caenorhabditis elegans*, il a été montré récemment qu'il est le déterminant testiculaire chez les oiseaux où il est localisé sur le chromosome sexuel Z et agit en double dose pour induire la différenciation testiculaire chez les mâles ZZ. Chez les mammifères présentant un système XX/XY, *SRY* est le gène déterminant du testicule. Selon les résultats obtenus chez la souris, *DMRT1* n'est pas impliqué dans la détermination testiculaire puisque les mutations de ce gène affectent uniquement la différenciation testiculaire post-natale et la fertilité dans ce modèle représentatif des rongeurs. Néanmoins, des patients humains avec des mutations affectant DMRT1 ont une dysgénésie testiculaire (46, XY DSD – femme XY) suggérant un rôle plus précoce de ce gène dans la différenciation gonadique chez les mammifères non rongeurs. Cette thèse a ainsi consisté à caractériser l'implication de DMRT1 dans (i) la différenciation gonadique ainsi que dans (ii) la fertilité des mâles et des femelles grâce à l'analyse de lapins mutants pour *DMRT1* générés par le système CRISPR/Cas9. Le lapin, représentant des lagomorphes, est utilisé ici comme un modèle animal des mammifères non-rongeurs. Dès le développement gonadique précoce, les lapins XY homozygotes pour la mutation ont un phénotype d'inversion sexuelle de type mâle vers femelle (femelle XY) et développent des ovaires. DMRT1 est donc un facteur clé de la détermination testiculaire chez le lapin. Nous avons aussi mis en évidence que chez les femelles, il régule la voie *RSPO1*/*WNT4*/*β-caténine*. En l'absence de DMRT1, les gonades *DMRT1*$^{-/-}$, qu'elles soient XX ou XY, présentent un retard de différenciation des cellules somatiques ovariennes. Ce rôle dans la différenciation précoce de l'ovaire n'avait jusque-là jamais été décrit chez toutes les différentes espèces étudiées (vertébrés et non vertébrés). Chez les femelles, nous démontrons également pour la première fois que DMRT1 est également crucial pour la méiose des cellules germinales. Son absence est en effet associée à un blocage méiotique très précoce entrainant une absence de formation des follicules primordiaux et donc une stérilité des lapines *DMRT1*$^{-/-}$, qu'elles soient XX ou XY. Son expression dans les cellules germinales détectées plus d'une semaine avant l'initiation de la méiose permet le recrutement de facteurs clés tels que DMC1, REC8 et STRA8 qu'il régule directement. De par son expression dans les deux principaux types cellulaires de la gonade (cellule somatique de soutien et cellule germinale), DMRT1 exerce des rôles clés tout au long de la différenciation puis du développement gonadique dans les deux sexes. Nos travaux démontrent que le gène *DMRT1* doit être considéré comme un acteur majeur de la différenciation gonadique et de la fertilité dans les deux sexes, chez les mammifères non-rongeurs. Les implications de ce gène dans différentes pathologies reproductives chez l'homme doivent être réévaluées. En effet, à l'image du gène *NR5A1*, des variants géniques de *DMRT1* pourraient être à l'origine d'autres cas d'azoospermie et d'insuffisance ovarienne, en plus des quelques cas de dysgénésie gonadique de type femme XY déjà décrits.

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)

Title : Role of DMRT1 in determining sex and fertility – Phenotypic analyses of DMRT1 KO rabbits

Keywords : Sex determination, Gonads, Fertility, Sertoli cells, Germ cells

Abstract : DMRT1 is the Testis Determining Factor in many vertebrates. Discovered in Drosophila and worms, it has recently been shown to be the Testis Determining Factor in birds, where the Z chromosome carries it and acts in two copies to induce testicular differentiation in ZZ males. SRY is the testis-determining gene in mammals with an XX/XY system. According to the mouse species, DMRT1 has no further functions in testis determination since Dmrt1 mutations only affect postnatal testis differentiation and fertility in this rodent model. Nevertheless, human patients with DMRT1 mutations exhibit testicular dysgenesis (46, XY DSD – Woman XY), suggesting an earlier role for DMRT1 in non-rodent mammals. My thesis characterizes the involvement of DMRT1 in (i) gonadal differentiation and (ii) male and female fertility thanks to the analysis of DMRT1 mutant rabbits generated using CRISPR/Cas9. The rabbit, representing lagomorphs, was used as a non-rodent mammalian model. From the earliest stages of gonadal development, XY homozygous rabbits showed a male-to-female sex reversal (XY female) and developed ovaries. DMRT1 is a critical player in sex determination in rabbits. We have also demonstrated that it regulates the RSPO1/WNT4/β-catenin signaling pathway in females. *DMRT1*$^{-/-}$ gonads, whether XX or XY, showed a delay in ovarian somatic cell differentiation. This role in early ovarian differentiation has never been described in any vertebrate and non-vertebrate species. In females, we also highlighted the DMRT1 implication in germ cell meiosis for the first time. Its absence is associated with meiotic blockade, leading to the absence of primordial follicle formation and sterility in *DMRT1*$^{-/-}$ rabbits, whether XX or XY. The DMRT1 expression detected in germ cells more than a week before the onset of meiosis leads to the recruitment of critical factors such as DMC1, REC8, and STRA8, which it directly regulates. Due to its expression in the two main cell types of the gonad (supporting somatic cell and germ cell), DMRT1 plays key roles throughout gonadal differentiation and development in both sexes. Our work shows that DMRT1 must be considered as a major player in gonadal differentiation and fertility in both sexes in non-rodent mammals. The implications of this gene in various human reproductive pathologies need to be reassessed. Like the NR5A1 gene, DMRT1 gene variants may be responsible for other cases of azoospermia and ovarian failure, in addition to the few cases of female XY gonadal dysgenesis already described.

Aux étoiles qui veillent sur moi et tout particulièrement à celle qui brille depuis le 21 avril 2018. Ma petite Aline, le destin t'a enlevé la vie bien trop vite, laissant un énorme vide, toi qui étais si solaire. Puisque d'où tu es, toi aussi tu m'as porté pendant ces années, cette thèse elle est pour toi…

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer l'ensemble de mes travaux de thèse. Je remercie Marie-Christine Chaboissier et Serge Nef d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit ainsi que Virginie Rouiller-Fabre et Hélène Bouraïma-Lelong d'avoir été les examinatrices. Je remercie également Julie Cocquet et Francis Poulat, membres de mon comité de suivi pour leur accompagnement, leurs conseils et leurs recommandations qui m'ont guidé tout au long de ces trois années. Un merci particulier à Francis pour le ChIP et son aide pour les analyses.

Je tiens ensuite à remercier mes deux encadrants de thèse, Maëlle Pannetier et Eric Pailhoux, qui sont bien évidemment pour beaucoup dans mes travaux et ce manuscrit. Je suis passée par tous les états au cours de ces trois années, mais, chacun à votre façon, vous m'avez épaulée et accompagnée de sorte à ce que j'arrive à donner le meilleur de moi-même. Merci d'être si passionnés et passionnants. Je suis extrêmement reconnaissante de vous avoir eu comme encadrants. Et surtout, merci à vous d'avoir répondu à toutes « mes petites questions » et de m'avoir transmis votre savoir.

Maëlle, ton soutien a toujours été sans failles. Comme tu le dis, tu peux avoir tendance à « materner » tes étudiants, mais cela correspondait très bien à mon caractère. Et puis, bien lancée, j'ai finalement pu commencer à prendre mon envol après ton départ. Tes idées débordantes, tout comme tes mots réconfortants, m'ont permis d'avancer en prenant confiance petit à petit. Tu as toujours su trouver les mots pour me rebooster quand j'en ai eu besoin.

Eric, c'est au cours de cette troisième année que j'ai le plus interagit avec toi. Comme avec Maëlle, j'ai pu trouver en toi un encadrant rempli d'idées, surtout après les congrès (comme quoi ça sert de faire des nuits blanches de jour…) ! Cela m'a permis de toujours vouloir aller plus loin et creuser une nouvelle piste, mais voilà, trois ans ça passe vite et ce n'est pas vraiment possible d'aller au bout de tout.

Deux autres personnes m'ont également apporté un soutien en toutes épreuves et ont été comme des grandes sœurs, des confidentes pour moi : Marjo et Aurélie D. Merci les filles pour votre bienveillance, vos nombreux conseils, votre réconfort (j'ai beaucoup trop pleuré pendant ces trois années) et nos marches digestives puisque le lundi, c'est le grand tour 😊 . Marjo, nos caractères similaires (team 06/09 !) ont fait que de nombreuses fois, nous n'avions même pas besoin de parler pour se comprendre. Tu es vraiment une personne exceptionnelle et je suis

ravie de te compter parmi mes amies. Aurélie, la « serial manipeuse », c'est toi qui m'as guidé à la paillasse à mon arrivée. J'ai rapidement vu que je pouvais me confier à toi et j'ai essayé d'apprendre de ta capacité à prendre les choses avec plus de légèreté. Je nous souhaite de continuer à être épanouies dans ce que nous faisons et surtout continuer à discuter de tout et de rien. J'ai tellement aimé travailler et partager ces trois années avec vous, ça va me manquer !

Je souhaite ensuite remercier la personne qui m'a tout appris sur le lapin, de la gestion avec l'animalerie jusqu'à me « confier » ces lapins DMRT1 après de nombreuses galères pour générer la lignée. Geneviève, je n'ai pas eu l'occasion (et la chance) de travailler avec vous tout au long de ma thèse, mais le temps passé à vos côtés m'a permis de beaucoup apprendre. Toujours disponible, à l'écoute et de bons conseils donc merci Geneviève (un jour peut-être j'arriverais à vous tutoyer !).

Je tiens ensuite à remercier tous les membres de l'équipe DGP de m'avoir accueillie pendant ces trois années. Merci Béa de m'avoir guidé dans mes premiers pas sur le chemin des analyses bio-info. Ça m'a effrayé au début puis en creusant, je suis maintenant avide d'apprendre à faire de nouvelles choses. Merci aussi à toi pour ta présence dans les moments difficiles. Merci Corinne pour vos encouragements. Merci Dominique pour tes conservations toutes aussi riches que farfelues. Merci Elo et Eugénie pour votre bonne humeur et les petits cafés du matin. Iris, bonne continuation.

J'en profite aussi pour remercier Nathalie DC qui avait récolté des infos pour moi sur cette thèse quand j'ai vu le sujet. Nathalie et Jean-Luc, nous n'êtes pas non plus innocents à ma présence ici donc merci. Et n'ayant pas eu l'occasion de le faire pour mon master 2 (mieux vaut tard que jamais), je tenais à remercier toute l'équipe des MODIT de m'avoir accueillie en stage de M2. Ce stage a été particulier avec le confinement mais j'ai été ravie d'interagir avec vous tous.

Je tiens également à adresser un petit mot à l'équipe de direction de l'unité BREED ainsi qu'aux gestionnaires. Merci Katia et Pascale pour votre soutien et plus particulièrement ces derniers mois. Merci Martine, Corinne et Claire pour votre disponibilité et votre accompagnement dans les diverses démarches administratives. J'en profite aussi pour remercier Olivier S qui m'a vu grandir depuis le master 1. Je me souviens avoir été impressionnée par ce grand monsieur à mon arrivée, mais petit à petit, ses précieux conseils m'ont rassuré. Et surtout,

merci Olivier d'être passé fin juillet par hasard devant mon bureau. Cette conversation a permis que je me sente mieux pour finir cette thèse.

Parmi les autres personnes de l'unité, je souhaite évidemment remercier Anne F et Luc, vous aussi vous m'avez donné goût aux analyses bio-info. Merci Olivier D pour avoir sauvé mon western-blot si précieux ! Merci Aurélie B et Marie pour votre gentillesse. Merci Eli (puis Marie) pour les CASA. Merci Audrey et Mélanie J pour vos conseils en immuno ou en qPCR. Merci Mélanie P et Romina pour votre accueil à mon arrivée, ça a été un plaisir de partager votre bureau.

Je tiens aussi à remercier Julie et Marthe du plateau histo. Merci les filles pour votre aide technique et vos conseils. Vous avez aussi su être à mon écoute pendant mes coups de mou. Et merci à Gwendoline ainsi qu'à tout le personnel de l'animalerie SAAJ. Rien n'aurait été possible sans votre travail quotidien auprès des lapins.

Durant ma dernière année, j'ai eu l'occasion de faire partie du mentorat « Femmes et Sciences ». Je souhaite donc remercier ma mentore, Delphine Lazaro. Delphine, ton regard extérieur m'a permis de m'ouvrir et tes nombreux conseils m'ont beaucoup aidée. Merci de m'avoir guidé pendant cette dernière année et d'avoir eu des mots justes. J'ai trouvé mon leitmotiv grâce à toi : peu importe les circonstances, j'y arriverais ! Je tenais également à remercier les organisatrices du mentorat, vous faites un sacré boulot. Les différents ateliers et discussions que vous proposez sont top et m'ont énormément appris.

J'ai aussi eu l'occasion de participer à des congrès et notamment celui organisé à Hawaï. Après en avoir entendu parler dès le début de ma thèse, je suis reconnaissante d'avoir eu la chance d'y aller. Ce congrès a été très enrichissant scientifiquement, mais aussi humainement. Merci aux « Hawaiian tourists » (Maëva, Louise et Sonboon) et à toute la troupe des européens d'avoir contribué à rendre cette aventure inoubliable.

Je terminerais par ma famille et mes amis qui m'ont vue passer par tous les états. Par moment, vous avez dû penser que j'étais folle de m'engager à ce point. Et oui, je pense qu'il faut un peu de folie pour faire une thèse. Un merci très particulier à mes parents. Papa, Maman, merci pour tout ce que vous avez toujours fait, c'est grâce à vous que je suis là. Ça n'a pas toujours été facile, mais vous avez fait votre maximum pour nous et vous nous avez inculqué de précieuses valeurs. Parrain et Nono, nous ne sommes pas très démonstratifs dans la famille,

mais à votre façon vous m'avez épaulée et encouragée. Ces derniers mois ont été particulièrement éprouvants, mais ensemble et soudés nous surmontons ce que nous avons vécu (seul on va plus vite, ensemble on va plus loin). Merci Momone pour ta bonne humeur en toutes circonstances, tu arrives à nous faire rire à n'importe quel moment de la journée. Je tiens aussi à remercier les personnes qui m'ont entourée et soutenue : Paupau, Poulette, mes Corbi, Marion (bon courage pour la dernière année 😉), les tontons/tatas, les cousins/cousines… Merci à tous d'avoir été là dans les bons moments, mais aussi dans les moins bons !

MERCI à toutes et tous (et aussi à ceux que j'ai oublié, désolée !). Chacun d'entre vous a contribué à ma réussite et a fait en sorte que j'arrive à aller au bout.

Table des matières

Table des matières 1

Liste des abréviations 5

Liste des illustrations 10

Préambule 13

INTRODUCTION

CHAPITRE I : Origine et formation des gonades indifférenciées 15

A) Origine du mésonéphros 15

B) Formation de la gonade bipotentielle 15

C) Spécification et migration des CGP 17

D) Précurseurs des différentes lignées somatiques des gonades 20

1. *Les différents types de cellules somatiques* 20

2. *Les précurseurs des cellules de soutien* 20

CHAPITRE II : La différenciation testiculaire 23

A) Mécanismes cellules associés à la formation d'un testicule 23

1. *Spécification du lignage des cellules de Sertoli* 23

2. *Compartimentalisation du testicule* 25

3. *Expansion des cordons testiculaires* 27

4. *Formation du rete testis* 27

B) Facteurs génétiques contrôlant la différenciation testiculaire 28

1. *Le facteur déterminant du testicule* 28

a. *Régulation de l'expression de SRY* 29

b. *Expression et cibles de SRY* 30

c. *Déterminants testiculaires chez les vertébrés* 32

2. *SOX9, le gène directeur de la différenciation testiculaire* 33

a. *Expression de SOX9* 33

b. *Régulation de la localisation nucléaire de SOX9* 34

c. *Rôle nécessaire et suffisant de SOX9 dans la différenciation testiculaire* 34

d. *Régulation transcriptionnelle de l'expression de SOX9* 36

e. *Signature génomique et cibles de SOX9* 40

3. Différenciation des cellules de Leydig et mise en place de la stéroïdogenèse 41
C) Engagement des cellules germinales vers leur voie de différenciation 42
D) Mise en place de la spermatogenèse 45

CHAPITRE III : La différenciation ovarienne **47**
A) Les grands aspects morphogénétiques de la différenciation ovarienne 47
1. Morphogenèse précoce de l'ovaire 47
2. Contrôle de l'entrée en méiose des cellules germinales femelles 48
3. Fragmentation des cordons ovigères et formation des follicules 50
B) Contrôle génétique de la différenciation ovarienne 53
1. La voie RSPO1/WNT4/β-caténine 53
a. Description de la voie WNT/β-caténine canonique 54
b. Expression de WNT4 et RSPO1 dans les gonades femelles 55
c. Rôles de WNT4 et RSPO1 dans l'ovaire de souris 55
d. Mutations de WNT4 et RSPO1 chez l'humain 58
2. FOXL2, un acteur clé de la différenciation et/ou du maintien des cellules de la granulosa 58
a. Expression et localisation de FOXL2 dans l'ovaire 59
b. Rôles de FOXL2 dans l'ovaire de souris 59
c. Cibles de FOXL2 dans l'ovaire de souris 61
d. Rôles de FOXL2 dans l'ovaire de chèvre 62

CHAPITRE IV : DMRT1, un facteur clé de la fonction testiculaire **64**
A) La famille des protéines DMRT 64
B) Analyse de l'expression de DMRT1 65
1. Expression de Dmrt1 dans les gonades de souris 65
2. Expression de DMRT1 dans les gonades humaines 66
3. Régulation de l'expression de DMRT1 66
C) DMRT1, un TDF chez de nombreuses espèces de vertébrés 67
1. DMY/DMRT1Y chez le médaka 68
2. Dmrt1 chez le tilapia 68
3. DMRT1 et DM-W chez le xénope 69
4. DMRT1 chez le poulet 70
5. Dmrt1 chez la tortue de Floride 71

D) Quel(s) rôle(s) pour DMRT1 chez la souris ? 72

1. *Implication au cours du développement testiculaire* 72

a. DMRT1 et pro-spermatogonies/spermatogonies 73

b. DMRT1 et les cellules de Sertoli 74

c. Cibles de DMRT1 dans le testicule de souris 77

d. Importance du fond génétique 78

2. *Implication dans le développement ovarien* 79

E) Mutations affectant *DMRT1* chez l'Homme 79

1. *Mutations et désordres du développement sexuel* 79

2. *Mutations et infertilité masculine* 82

3. *Mutations et infertilité féminine* 83

F) Et les autres gènes *DMRT* ? 84

1. *Expression des gènes de la famille DMRT dans les gonades* 84

2. *Rôles des DMRT* 85

CHAPITRE V : Objectifs de la thèse **87**

RÉSULTATS

Développement gonadique chez le lapin **90**

Article : DMRT1 is a testis determining gene in rabbits and is also essential for female fertility

Résultats complémentaires et discussion **91**

A) Détermination des cibles de DMRT1 chez le lapin à 28 j*pc* 92

1. *Données de ChIP-seq DMRT1 dans le testicule* 92

a. Distribution des pics sur le génome 92

b. Analyse du motif de fixation 92

c. Ontologie des gènes cibles de DMRT1 dans le testicule 93

2. *Données de ChIP-seq SOX9 dans le testicule* 93

a. Distribution des pics sur le génome 93

b. Analyse du motif de fixation 93

3. *Données de ChIP-seq DMRT1 dans l'ovaire* 94

a. Distribution des pics sur le génome 94

b. Analyse du motif de fixation 94

c. Ontologie des gènes cibles de DMRT1 dans l'ovaire 95
4. *Données de ChIP-seq FOXL2 dans l'ovaire* 95
a. Distribution des pics sur le génome 95
b. Analyse du motif de fixation 96
c. Ontologie des gènes cibles de FOXL2 dans l'ovaire 96
B) Caractérisation des gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc* 97
1. *Profil transcriptomique obtenu par RNA-sequencing sur gonades entières* 97
a. L'inversion sexuelle des XY DMRT1$^{-/-}$ *est précoce* 97
b. La différenciation ovarienne est retardée chez les XX DMRT1$^{-/-}$ 101
c. La différenciation gonadique précoce est altérée chez les DMRT1$^{-/-}$ 105
2. *Analyses histologiques* 107
C) Caractérisation du blocage méiotique chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ 110
1. *Développement des cellules germinales femelles chez le lapin* 110
2. *A quel stade les cellules germinales sont-elles bloquées en l'absence de DMRT1 ?* 112
3. *Quels facteurs, en aval de DMRT1, peuvent être la cause du blocage méiotique ?* 115

CONCLUSION

Conclusion générale et perspectives **119**

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques **123**

ANNEXES

Annexe 1 : Absence of testicular estrogen leads to defects in spermatogenesis and increased semen abnormalities in male rabbits
Annexe 2 : Génétique de la différenciation gonadique, une étape clé du déterminisme du sexe et de la fertilité à l'âge adulte
Annexe 3 : Méthodologie du ChIP-sequencing

COMMUNICATIONS

Liste des communications **145**

Liste des abréviations

3β-HSD	3-beta-HydroxySteroid Dehydrogenase
5mC	5'méthyl-cytosine
ADN	acide désoxyribonucléique
AMH	Anti-Mullerian Hormone
AMHR2	Anti-Müllerian hormone receptor type 2
AMHY	Y-linked anti-Müllerian hormone
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AR	Androgen Receptor
ASIC4	Acid Sensing Ion Channel subunit family member 4
ATAC-seq	Assay for Transposable-Accessible Chromatin - sequencing
BCL11B	B-Cell Lymphoma/Leukemia 11B
BLIMP1	B Lymphocyte Induced Maturation Protein 1
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BMP8b	Bone Morphogenetic Protein 8b
BPES	Blepharophimosis-Ptosis-Epicathus inversus Syndrome
BrdU	Bromodésoxyuridine
CBLN4	Cerebellin 4 precursor
CBX2	Chromobox 2
CGP	cellules germinales primordiales
ChIP-seq	Chromatin ImmunoPrecipitation - sequencing
CNV	Copy Number Variant
COUPTFII	Chicken Ovalbumin Upstream Promoteur Transcription Factor II
CTNNB1	Catenin beta 1
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
CYP11A1	Cytochrome P450 family 11 subfamilly A member A1
CYP17A1	Cytochrome P450 family 17 subfamilly A member A1
CYP19A1	Cytochrome P450 family 19 subfamilly A member A1
CYP26B1	Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DAZL	Deleted in Azoospermia Like
DDX4	Dead-box helicase 4
DDX17	Dead-box helicase 17
DHH	Desert Hedgehog
DKK1	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
DKK2	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2
DKK3	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3
DMC1	DNA Meiotic recombinase 1
DMRT1	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1

DMRT2	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 2
DMRT3	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 3
DMRT4	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 4
DMRT5	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 5
DMRT6	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 6
DMRT7	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 7
DMY	the DM-domain gene on the Y chromosome
DM-W	W-linked DMRT1 paralogue
DNMT3L	DNA MethylTransferase 3 Like
DSD	désordres du développement sexuel
dsx	doublesex
DVL	Dishevelled segment polarity protein
DVL2	Dishevelled segment polarity protein 2
eALDI	enhancer Alternative Long-Distance Initiator
EGR1	Early Growth Response 1
EIF2S3	Eucaryotic translation Initiation Factor 2 subunit gamma
Enh13	Enhancer 13
ERK1	Extracellular signal-Regulated Kinase 1
ERK2	Extracellular signal-Regulated Kinase 2
ERR-β	Estrogen Related Receptor β
ESR1	Estrogen Receptor 1
ESR2	Estrogen Receptor 2
eSR-A	Sex-Reversal Enhancer A
eSR-B	Sex-Reversal Enhancer B
FGF4	Fibroblast Growth Factor 4
FGF9	Fibroblast Growth Factor 9
FGFR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
FISH	Fluorescence *in situ* hybridization
FOG2	FOG family member 2
FOXB2	Forkhead box B2
FOXL2	Forkhead box L2
FOXL3	Forkhead box L3
FSH	Follicular Stimulating Hormone
FST	Follistatin
FZD	Frizzled
FZD1	Frizzled Class Receptor 1
FZD4	Frizzled Class Receptor 4
FZD5	Frizzled Class Receptor 5
FZD9	Frizzled Class Receptor 9
γH2AX	H2A histone family member X
GADD45γ	Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene family 45 gamma
GATA4	GATA Binding Protein 4
GCL	Germ Cell-Less
GCNA1	Germ Cell Nuclear Antigen 1

GFP	Green Fluorescent Protein
GNL2	G protein Nucleolar 2
GREM2	Gremlin 2
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
H3K9me2	bi-méthylation de la lysine 9 de l'histone 3
H3K27Ac	acétylation de la lysine 27 de l'histone 3
HDAC1	Histone Deacetylase 1
HDAC4	Histone Deacetylase 4
HES	Hematoxylin-Eosin-Safran
HIS	Hybridation *in situ*
HMG1	HydroxyMethylGlutaryl-CoA reductase 1
HMG2	HydroxyMethylGlutaryl-CoA reductase 2
HMG	High Mobility Group
IDR	Irreproducibility Discovery Rate
IHC	immunohistochimie
IF	immunofluorescence
IGF1R	Insulin Like Growth Factor 1 Receptor
IGV	Integrative Genomic Viewer
INHBB	Inhibin subunit Beta B
INSL3	Insulin-Like factor 3
INSR	Insulin receptor
IOP	Insuffisance ovarienne prématurée
IPs	immunoprécipitations
jpc	jours *post-coïtum*
jpp	jours *post-partum*
JMJD1A	Jumonji domain containing 1A
KANK1	KN motif and ankyrin repeat domains 1
KAP1	KRAB-Associated Protein 1
kb	kilobases
KIRREL3	Kirre Like nephrin family adhesion molecule 3
KL	kit ligand
KRAB-O	Krüppel-Associated Box Only
LEF	Lymphoid Enhancer Factor Family
LEF1	Lymphoid Enhancer Factor Family 1
LGR4	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled Receptor 4
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5
LH	Luteinizing Hormone
LHX9	LIM Homeobox 9
LiCl	chlorure de lithium
LIM1	LIM homeobox 1
LRP	Low density lipoprotein Receptor-related Protein
LRP6	Low density lipoprotein Receptor-related Protein 6

MAP3K4	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4
MEIOC	Meiosis specific with Coiled-Coil domain
MILI	Miwi-Like
MIS	Mullerian Inhibitor Substance
MVH	Mouse Vasa Homolog
NANOG	NANOG homeobox
NANOS2	Nanos C2HC-type zinc finger 2
NANOS3	Nanos C2HC-type zinc finger 3
NDR	Nucleosome-Depleted Region
NODAL	NODAL growth differentiation factor
NR0B1	Nuclear Receptor subfamily 0 group B member 1
NR5A1	Nuclear Receptor subfamily 5 group A member 1
OAS3	2'-5'-OligoAdenylate Synthetase 3
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
Ods	Odsex
OSE	Ovarian Surface Epithelium
PAX8	Paired box gene 8
pb	paire des bases
PGD2	Prostaglandine 2
P-H3	phospho-histone 3
PIS	Polled/Intersex Syndrome
PISRT1	PIS-regulated transcript 1
PKA	Protein Kinase A
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger
POU5F1	POU class 5 homeobox 1
PRDM1	PR Domain zinc finger protein 1
PRDM14	PR Domain zinc finger protein 14
PTCH1	Patched 1
PTGDS	Prostaglanin D2 synthase
RA	Retinoic Acid
RALDH1	Retinaldehyde Deshydrogenase 1
RARα	Retinoic Acid Receptor alpha
RARβ	Retinoic Acid Receptor bêta
RARγ	Retinoic Acid Receptor gamma
REC8	REC8 meiotic recombination protein
RNF43	Ring Finger Protein 43
RREB1	Ras Responsive Element Binding Protein 1
RSPO1	R-Spondin 1
RT-qPCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RUNX1	RUNX family transcription factor 1
scRNA-seq	single-cell RNA-sequencing

SDF1	Stromal cell-Derived Factor 1
SF1	Steroidogenic Factor 1
SFRP2	Secreted Frizzled Related Protein 2
SIX1	SIX Homeobox 1
SIX4	SIX Homeobox 4
SLCs	Supporting-Like Cells
SMAD1	SMAD family member 1
SMAD5	SMAD family member 5
SNP	Single Nucleotide Polymorphisme
SOHLH1	Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 1
SOX2	SRY-box transcription factor 2
SOX3	SRY-box transcription factor 3
SOX9	SRY-box transcription factor 9
SP1	Specific Protein 1
SRY	Sex-determining Region of the Y chromosome
SSC	Spermatogonial Stem Cell
SSEA1	Stage Specific Embryonic Antigen 1
STAT2	Signal Transducer and Activator of Transcription 2
STRA8	Stimulated by Retinoic Acid 8
SYCP3	Synaptonemal Complex Protein 3
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TCF	T Cell Factor
TCFL5	Transcription Factor Like 5
TDF	Testis Determining Factor
TES	Testis-specific enhancer of *Sox9*
TESCO	TES core
TNAP	Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase
TSS	Transcription Start Site
TTS	Transcription Terminal Site
UTR	Untranslated Transcribed Region
WDR91	WD Repeat-containing protein 91
WNT2B	WNT family member 2B
WNT4	WNT family member 4
WNT5A	WNT family member 5A
WNT5B	WNT family member 5B
WT1	Wilms' Tumor 1
XYSR	XY Sex reversal Region
ZNRF3	Zinc And Ring Finger 3
ZO-1	Zona Occludens-1

Liste des illustrations

Liste des figures :

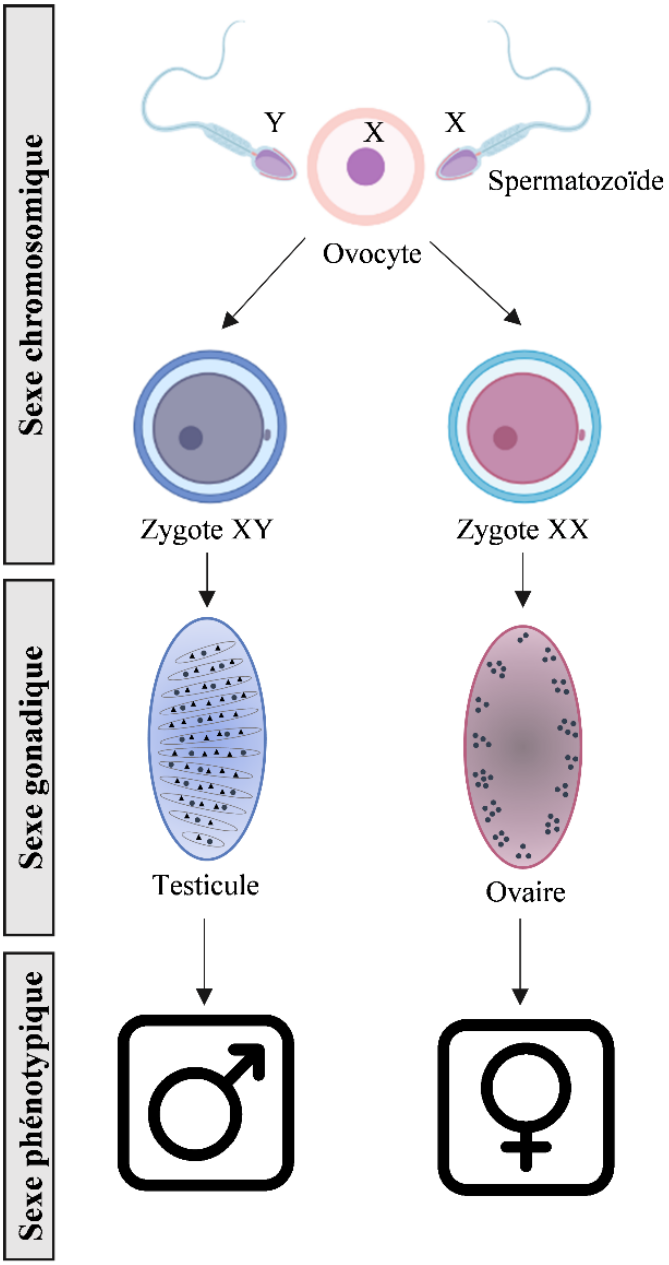
Figure 1 : Les grandes étapes du développement sexuel.
Figure 2 : Développement du système reproducteur.
Figure 3 : Formation du mésoderme à l'origine du mésonéphros.
Figure 4 : Régulation de l'expression de *Sf1* (*Nr5a1*) chez la souris.
Figure 5 : Migration des CGP puis colonisation des crêtes génitales chez la souris.
Figure 6 : Engagement des lignages cellulaires somatiques chez la souris.
Figure 7 : Morphologie du testicule adulte.
Figure 8 : Les évènements cellulaires de la différenciation testiculaire.
Figure 9 : Comparaison des séquences protéiques de SRY.
Figure 10 : Régulation de l'expression de *Sry* chez la souris.
Figure 11 : Fenêtre critique d'action de SRY pour la différenciation testiculaire chez la souris.
Figure 12 : Mise en évidence de l'implication du TES/TESCO dans la régulation de l'expression de *Sox9* chez la souris.
Figure 13 : Les différents enhancers présents dans les 1 500 kb en amont du gène *Sox9* chez la souris.
Figure 14 : Comparaison des sites de fixation de facteurs clés au niveau de l'enhancer 13.
Figure 15 : Régulation de l'expression de *SOX9* chez l'humain.
Figure 16 : Contribution des cellules somatiques dans la différenciation sexuelle des cellules germinales chez la souris.
Figure 17 : Licensing des cellules germinales et engagement dans la voie mâle chez la souris.
Figure 18 : Les trois grandes étapes de la spermatogenèse.
Figure 19 : Morphologie d'un ovaire adulte.
Figure 20 : Le cycle ovarien.
Figure 21 : Deux populations cellulaires à l'origine des cellules de la granulosa chez la souris.
Figure 22 : Activation de la voie WNT/β-caténine canonique.
Figure 23 : Principales fonctions de la voie RSPO1/WNT4/β-caténine au cours de la différenciation ovarienne chez la souris.
Figure 24 : Histologie des gonades de chèvres XX PIS$^{-/-}$.

Figure 25 : Arbre phylogénétique et structure des protéines DMRT1.
Figure 26 : Profils d'expression de *Dmrt1*/*DMRT1* chez la souris et l'humain.
Figure 27 : Régulation de l'expression de *Dmrt1* chez les rongeurs.
Figure 28 : Rôles de DMRT1 dans les cellules germinales chez la souris.
Figure 29 : Rôles de DMRT1 dans les cellules de Sertoli chez la souris.
Figure 30 : Position de différentes mutations impactant DMRT1 identifiées chez l'humain et associées à des 46, XY DSD avec dysgénésie gonadique.
Figure 31 : Les principales étapes du développement gonadique chez le lapin.
Figure 32 : Répartition des pics, motif de fixation et processus biologiques associés aux cibles de DMRT1 dans le testicule.
Figure 33 : Répartition des pics et motif de fixation de SOX9 dans le testicule.
Figure 34 : Répartition des pics, motif de fixation et processus biologiques associés aux cibles de DMRT1 dans l'ovaire.
Figure 35 : Répartition des pics, motif de fixation et processus biologiques associés aux cibles de FOXL2 dans l'ovaire.
Figure 36 : Signature transcriptomique spécifique aux gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*.
Figure 37 : Expression de *SOX9* et *SRY* dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*.
Figure 38 : Visualisation des données de ChIP-seq au niveau de différentes régions en amont du gène *SOX9*.
Figure 39 : Fixation de DMRT1 au niveau de la région RevSex à 562 kb en amont du gène *SOX9*.
Figure 40 : Expression de *RSPO1* dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*.
Figure 41 : Visualisation des données de ChIP-seq au niveau du gène *RSPO1*.
Figure 42 : Expression de *AXIN2*, *DKK1*, *DKK2* et *DKK3* dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 et 20 j*pc*.
Figure 43 : Répartition des gènes des clusters #2, #6 et #8 sur la heatmap à 20 j*pc*.
Figure 44 : Localisation de marqueurs somatiques et germinaux sur des gonades contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*.
Figure 45 : Localisation et expression de *WNT4* dans des gonades contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*.
Figure 46 : Localisation des SLCs exprimant PAX8 dans des gonades contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$ à 20 j*pc*.
Figure 47 : Localisation de DMRT1 comparée à celle de marqueurs des cellules germinales ou de cassures double brins au cours du développement gonadique fœtal.

Figure 48 : Localisation de DMRT1 comparée à celle de marqueurs des cellules germinales ou de cassures double brins au cours du développement gonadique post-natal.
Figure 49 : Localisation de POU5F1, DDX4 et γH2AX sur des gonades contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$ à 3 j*pp*.
Figure 50 : Morphologie des gonades XX contrôles et XX *DMRT1*$^{-/-}$ à 1 j*pp.*
Figure 51 : Perturbation de l'expression d'enzymes de la stéroïdogenèse dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$.
Figure 52 : Signature transcriptomique des gonades XX contrôles et XX *DMRT1*$^{-/-}$ à 1 j*pp*.
Figure 53 : Profils d'expression et visualisation des données de ChIP-seq au niveau du gène *STRA8*.
Figure 54 : Profils d'expression et visualisation des données de ChIP-seq au niveau des gènes *DMC1* et *REC8*.
Figure 55 : Profils d'expression et visualisation des données de ChIP-seq au niveau du gène *CYP26B1*.
Figure 56 : Rôles de DMRT1 dans les cellules de soutien mâles et femelles chez le lapin.
Figure 57 : Rôles de DMRT1 dans les cellules germinales femelles chez le lapin.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Principales cibles de DMRT1 dans le testicule de souris.
Tableau 2 : Composants de la voie WNT/β-caténine identifiés comme cibles de DMRT1 ou de FOXL2.



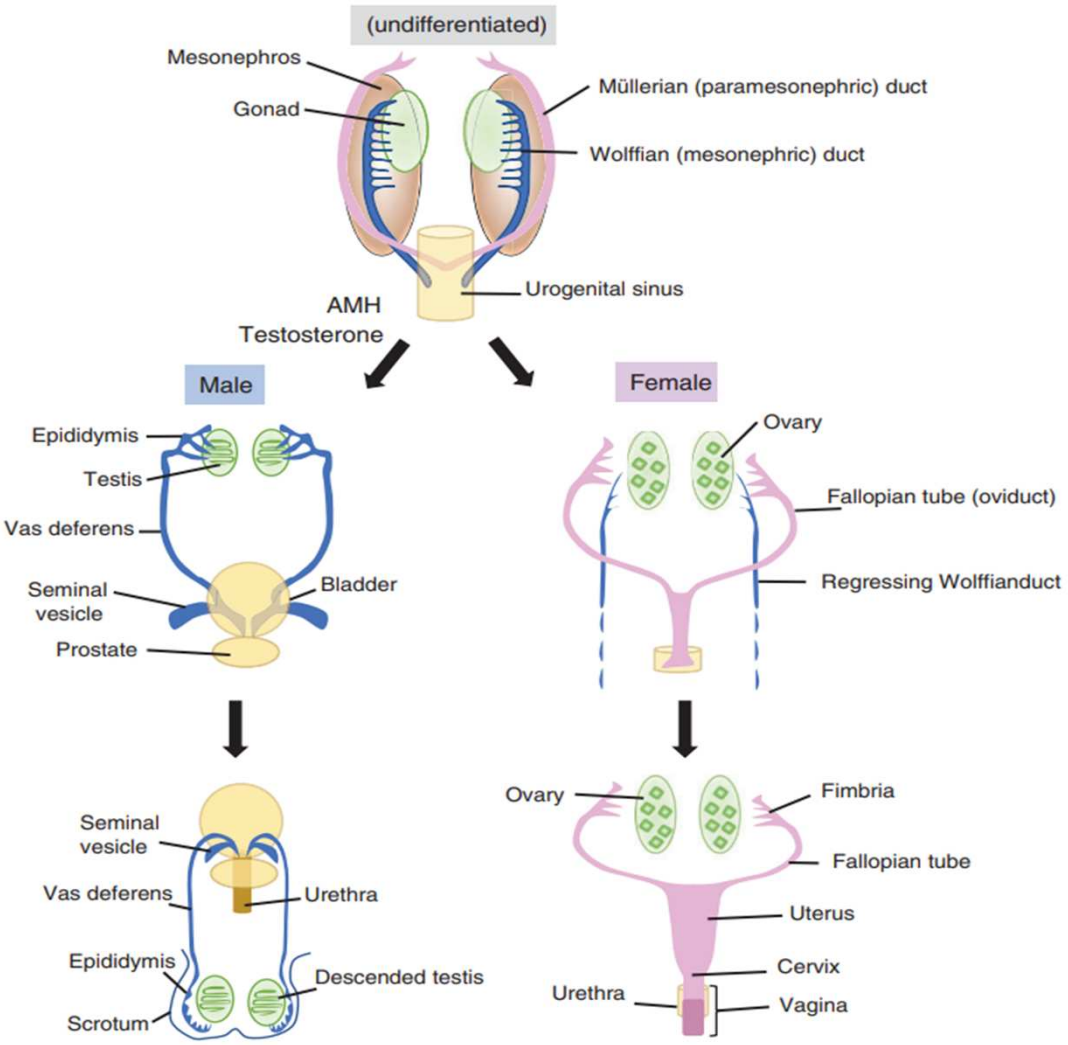
<u>Figure 1.</u> Les grandes étapes du développement sexuel.
Chez les mammifères, le développement sexuel se déroule en trois grandes étapes : le sexe chromosomique déterminé à la fécondation, contrôle génétiquement le sexe gonadique. Le chromosome sexuel Y porte en effet le gène déterminant du testicule alors que la différenciation de l'ovaire fait appel à des gènes portés par les chromosomes autosomiques. La production d'hormones par les testicules permettra la différenciation du sexe phénotypique mâle. Le sexe phénotypique femelle, lui ne nécessite pas de production hormonale par les ovaires.
Issu de Dujardin & Pailhoux, 2022.

Préambule

Chez les mammifères, la détermination du sexe débute dès la fécondation et se met en place à trois niveaux **(Figure 1)** :

- **Le sexe chromosomique** est déterminé lors de la fécondation par les chromosomes sexuels X et Y. L'embryon sera XY si un spermatozoïde Y féconde l'ovocyte X ou sera XX si c'est un spermatozoïde X.
- **Le sexe gonadique** est obtenu suite à la différenciation des gonades XY en testicule ou des gonades XX en ovaire. Cette différenciation est contrôlée par une cascade génétique et un ensemble de mécanismes cellulaires.
- **Le sexe phénotypique** correspond à la différenciation des organes génitaux internes et externes grâce aux hormones produites par les gonades différenciées (en particulier par les hormones testiculaires). Lors de la vie fœtale, deux types de canaux se développent chez les deux sexes : les canaux de Wolff et les canaux de Müller. Chez le mâle, les androgènes sont responsables du maintien des canaux de Wolff alors que la régression des canaux de Müller a lieu sous l'action de l'AMH (Anti-Müllerian Hormone). Ces canaux de Wolff se différencieront pour former les canaux efférents, l'épididyme, le canal déférent ainsi que les vésicules séminales. Chez la femelle, en revanche, les canaux de Wolff régressent tandis que les canaux de Müller sont maintenus. Ces derniers vont permettre la formation du pavillon, des oviductes (ou des trompes de Fallope chez la femme), de l'utérus, du col de l'utérus et de la portion supérieure du vagin (Roly *et al*, 2018) **(Figure 2)**. A la puberté, le développement des caractères sexuels secondaires (liés à la mise en place de l'axe gonadotrope et à la production de testostérone chez les mâles et d'œstrogènes chez les femelles) complète la mise en place du sexe phénotypique.

Chacun de ces niveaux de différenciation se fait en accord avec le précédent. Néanmoins, une discordance peut apparaitre entre sexe chromosomique et sexe gonadique (individu XX avec testicules) ou entre sexe gonadique et sexe phénotypique (individu XY avec testicules mais présentant un phénotype féminin). Ces perturbations du développement du sexe sont regroupées sous le nom de « Désordres du Développement Sexuel » (DSD). Les DSD sont définis comme étant des affections congénitales dans lesquelles le sexe chromosomique, gonadique ou phénotypique est atypique (Hughes *et al*, 2006). Ces DSD ont une incidence plus



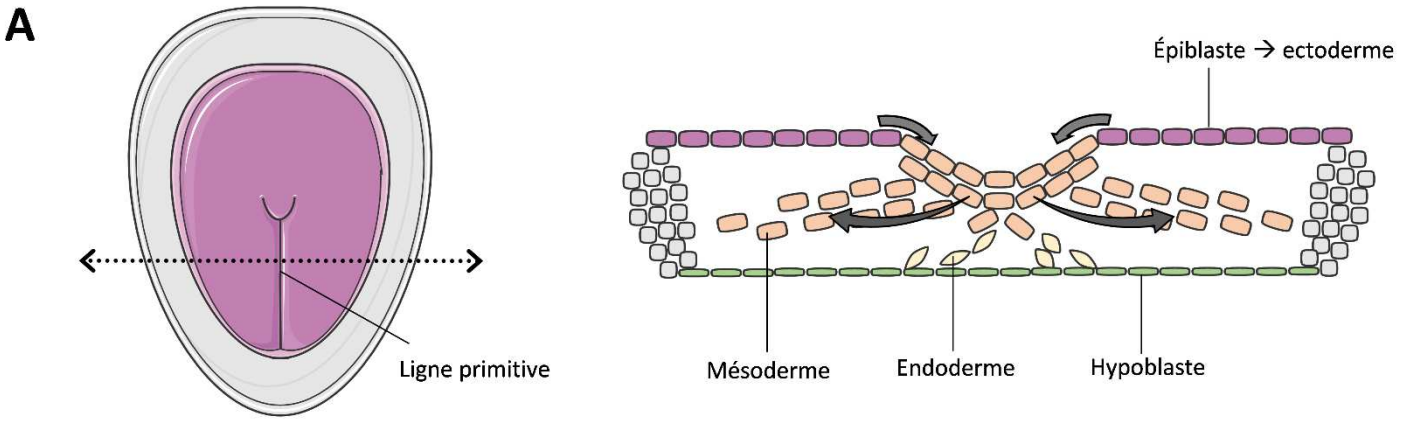
<u>Figure 2.</u> Développement du système reproducteur.
Comme les gonades, les canaux de Wolff et de Müller se forment à la surface du mésonéphros. Chez le mâle, seuls les canaux de Wolff persisteront sous l'action de l'AMH et de la testostérone notamment. Ils donneront ainsi les canaux efférents, l'épididyme, le canal déférent et les vésicules séminales. Chez la femelle, ce sont les canaux de Müller qui persistent et se différencient pour former les pavillons, les oviductes (ou trompes de Fallope), l'utérus et le tiers supérieur du vagin.
Issu de Rolly et al., 2018.

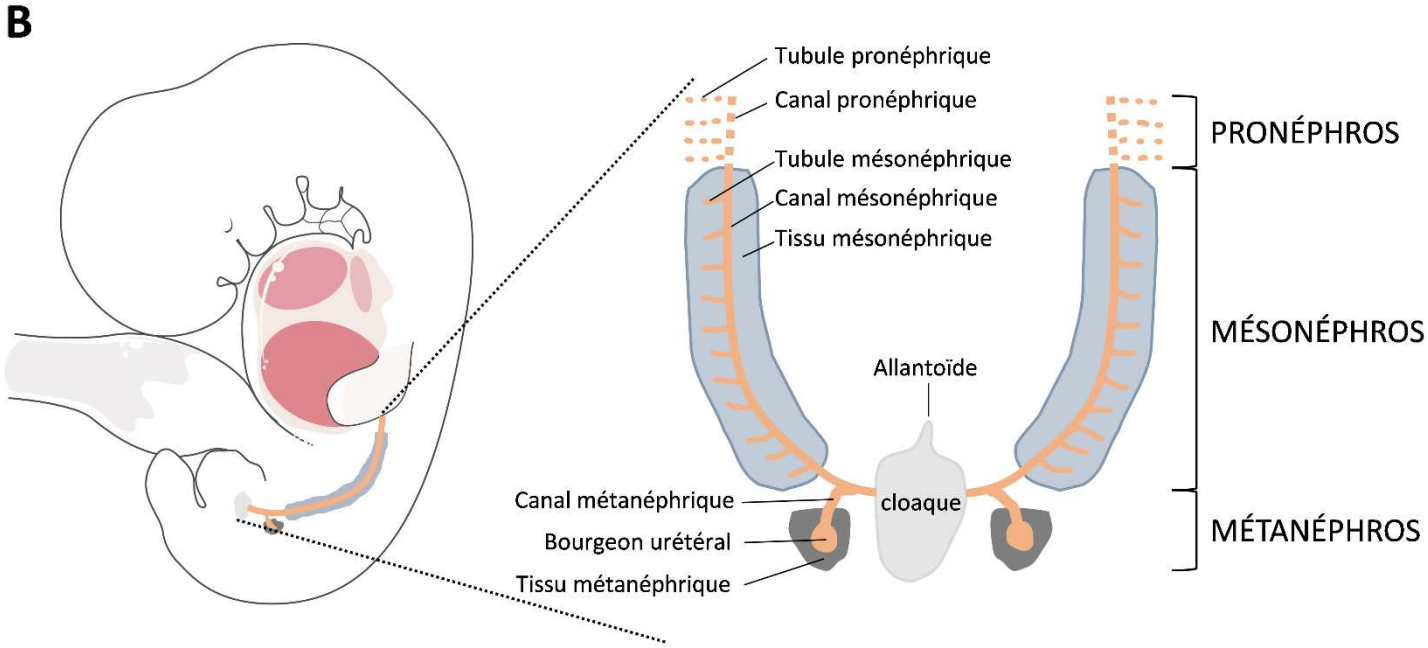
ou moins importante selon le phénotype qu'ils induisent. Ainsi, les anomalies gonadiques, correspondant à une discordance entre le sexe génétique et le sexe gonadique, touchent 1 naissance sur 4 500. Ces anomalies sont plus rares que les discordances du sexe phénotypique (Baskin *et al*, 2001; Ohnesorg *et al*, 2014).

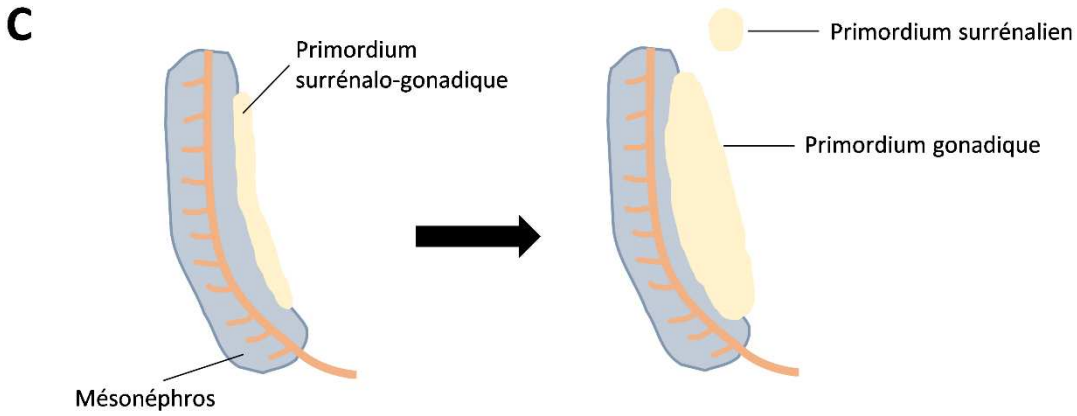
La mise en évidence des gènes clés de la détermination du sexe et de la différenciation gonadique a principalement été faite par l'étude de patients humains atteints de DSD. Alors que pour de nombreux gènes, le modèle murin a permis d'expliquer ces phénotypes et de comprendre les mécanismes sous-jacents, ce n'est pas le cas pour tous les gènes. Ainsi, mon laboratoire d'accueil a pu démontrer que *FOXL2* (Forkhead box L2) est un gène de la différenciation ovarienne chez la chèvre (Boulanger *et al*, 2014). Les gonades XX *FOXL2*$^{-/-}$ se différencient en testicules avec une expression de *DMRT1* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1) bien avant *SOX9* (SRY-box transcription factor 9) (Elzaiat *et al*, 2014), un des gènes clés de la différenciation testiculaire. C'est ainsi que l'intérêt a été porté sur DMRT1, chez une autre espèce de mammifères, le lapin.

Avant de présenter et discuter les résultats obtenus lors de mes travaux de thèse, mon manuscrit est composé de quatre chapitres d'introduction bibliographique. Je vais ainsi aborder l'origine et la formation des gonades indifférenciées, la différenciation testiculaire et la différenciation ovarienne puis détailler ce qui est connu du gène *DMRT1*.

INTRODUCTION







<u>Figure 3.</u> Formation du mésoderme à l'origine du mésonéphros.
(**A**) Au moment de la gastrulation, des cellules de l'épiblaste migrent au niveau de la ligne primitive formant ainsi l'endoderme et le mésoderme. Les cellules restantes de l'épiblaste formeront l'ectoderme à la surface de l'embryon. (**B**) Plus tard, au cours du développement, le mésoderme se différenciera en pronéphros, mésonéphros et métanéphros. Celui-ci sera le seul à persister et donnera le rein. (**C**) Un primordium surrénalo-gonadique se forme à la surface ventrale du mésonéphros. Par la suite, le primordium surrénalien va se séparer alors que le primordium gonadique ou crête génitale continuera à se développer à la surface du mésonéphros.
*Adapté de de Bakker et al., 2019 (**B**) et Nef et al., 2019 (**C**). Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.*

CHAPITRE I

Origine et formation des gonades indifférenciées

Chez les mammifères, la première étape du développement gonadique correspond à la formation des gonades indifférenciées ou bipotentielles, encore appelées crêtes génitales. Par la suite, l'expression spécifique de gènes en fonction du sexe chromosomique de l'individu (XY pour les mâles, XX pour les femelles) permettra la différenciation de ces gonades bipotentielles en testicules ou en ovaires.

A) Origine du mésonéphros

Au cours de l'embryogenèse, la gastrulation est une phase importante permettant le réarrangement et la spécification des feuillets germinaux dans le but de former un organisme (Solnica-Krezel & Sepich, 2012). Au cours de cette étape, des cellules pluripotentes de l'épiblaste pénètrent à travers la ligne primitive de l'embryon conduisant à la formation de deux feuillets embryonnaires : le mésoderme et l'endoderme. Le reste de l'épiblaste donne, quant à lui, les dérivés ectodermiques constituant le troisième feuillet (Davidson *et al*, 2019) **(Figure 3A)**.

En ce qui concerne le développement du système uro-génital, le mésoderme est le feuillet d'intérêt puisqu'il est l'origine des trois structures rénales successives chez les mammifères : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros **(Figure 3B)**. Le pronéphros dégénère rapidement, il est non fonctionnel, contrairement aux vertébrés inférieurs. Le métanéphros correspond au rein permanent chez les vertébrés supérieurs. Enfin, le mésonéphros permet la formation de la crête génitale puis régresse après la détermination du sexe (Kuure *et al*, 2000; Davidson *et al*, 2019).

B) Formation de la gonade bipotentielle

L'initiation de la formation de la gonade bipotentielle est caractérisée par la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique à la surface ventrale du mésonéphros. Le primordium surrénalo-gonadique apparait ainsi à 9.5 jours *post-coitum* (j*pc*) chez la souris **(Figure 3C)**. Cette structure est composée d'une population de progéniteurs communs et de cellules germinales primordiales (CGP). Elle se séparera à 10.5 j*pc* pour former le primordium

surrénalien, futures glandes surrénales, et le primordium gonadique qui donnera les crêtes génitales (Ikeda *et al*, 1994) **(Figure 3C)**. Plusieurs facteurs de transcription sont requis à la formation de ces crêtes : les deux principaux sont GATA4 (GATA Binding Protein 4) et NR5A1 (Nuclear Receptor subfamily 5 group A member 1 ; appelé SF1 (Steroidogenic Factor 1) dans ce manuscrit).

La crête génitale se forme selon une direction antéro-postérieure le long du mésonéphros. L'expression de GATA4 suit la même dynamique. Elle est détectée dès 10 j*pc* chez la souris au niveau de la moitié antérieure du primordium gonadique puis s'étend à la partie postérieure (Hu *et al*, 2013). Du fait de son expression au moment de l'initiation de la formation de la gonade bipotentielle, l'implication de GATA4 dans ce processus a été étudiée. Ainsi, une diminution de la prolifération des cellules épithéliales a été observée chez des souris présentant une délétion de *Gata4*. De plus, SF1 est absent chez ces souris (Hu *et al*, 2013). Exprimé dans l'épithélium cœlomique avant son épaississement, *Gata4* est un des gènes clés nécessaires à l'initiation de la gonadogenèse et à l'initiation de l'expression de SF1.

SF1 est quant à lui exprimé dès 10.2 j*pc* chez la souris dans la population de progéniteurs communs aux cellules somatiques (Hu *et al*, 2013). Le devenir de ces progéniteurs et notamment leur contribution à deux types cellulaires gonadiques peut ainsi être suivie grâce à cette expression de SF1. Il sera en effet ensuite retrouvé dans les gonades en développement des deux sexes avant de devenir spécifique du mâle à partir de 13.5 j*pc* (Ikeda *et al*, 1994). La délétion ciblée du gène *Ftz-F1* codant pour SF1 conduit à une absence totale de gonades et de glandes surrénales chez les embryons murins XX et XY (Luo *et al*, 1994).

L'expression de *Sf1* est donc importante à la formation du primordium surrénalo-gonadique et est finement régulée. En plus de *Gata4*, d'autres gènes ont en effet été décrits comme impliqués dans le contrôle de l'expression de *Sf1*.

Ainsi, l'absence de LHX9 (LIM Homeobox 9), exprimé dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses sous-jacentes, conduit à la réduction de l'expression de *Sf1* dans les crêtes génitales d'embryons de souris à 11.5 j*pc* (Birk *et al*, 2000). Il a aussi été montré que LHX9 et GATA4 sont coexprimés dans les cellules épithéliales sur toute la longueur de la crête génitale et que l'expression de *Lhx9* est fortement diminuée chez les embryons déficients pour *Gata4* (Hu *et al*, 2013). D'autres travaux ont mis en évidence la collaboration entre LHX9 et WT1 (Wilms' Tumor 1). Alors que l'inactivation de *Wt1* chez la souris a pour conséquence une absence totale de l'expression de *Sf1* quel que soit le stade, l'analyse de son promoteur a permis l'identification de site de fixation pour l'isoforme -KTS de WT1 et pour LHX9. Par des

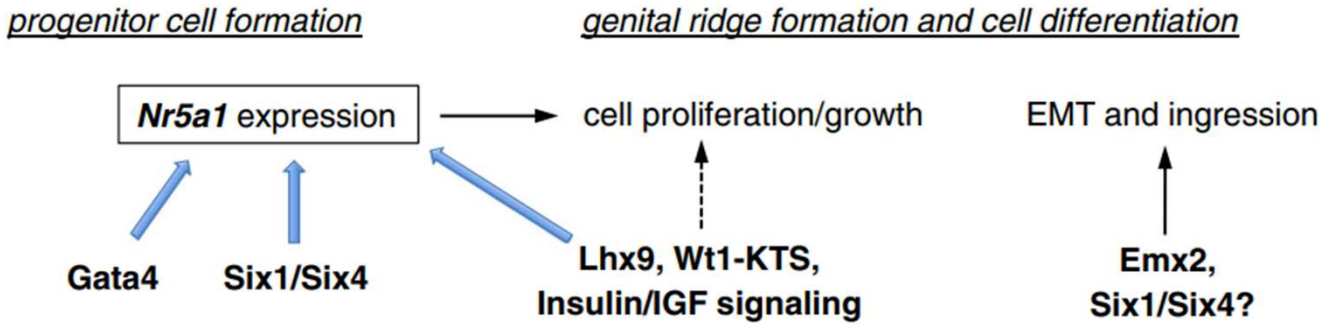


Figure 4. Régulation de l'expression de *Sf1* (*Nr5a1*) chez la souris.
Gata4, *Six1/Six4* sont impliqués dans la régulation de *Sf1* afin d'initier la formation des cellules progénitrices. Ensuite, *Lhx9*, l'isoforme –KTS de *Wt1* ainsi que la voie de signalisation à l'insuline régulent *Sf1* pour lui permettre d'induire la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique et ainsi la formation de la crête génitale. Enfin, *Six1* et *Six4* pourraient, comme *Emx2,* avoir un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse afin que les cellules de l'épithélium cœlomique colonisent les gonades.
Issu de Tanaka & Nishinakamura, 2014.

expériences de cotransfections, il a été montré que WT1 -KTS et LHX9 se lient de façon simultanée et qu'ils ont un effet additif pour activer le promoteur de *Sf1* (Wilhelm & Englert, 2002).

Deux autres gènes sont nécessaires à l'activation correcte de *Sf1* : *Six1* (SIX Homeobox 1) et *Six4* (SIX Homeobox 4) sont exprimés dès 9.5 j*pc* chez la souris dans la région où les précurseurs gonadiques seront générés. La double délétion de ces deux gènes conduit à une diminution du nombre de cellules SF1 positives dès 10.5 j*pc* et à l'absence de leur prolifération entre 10.5 et 11.5 j*pc* (Fujimoto *et al*, 2013). Ces données illustrent donc que GATA4, LHX9, l'isoforme -KTS de WT1, SIX1 et SIX4 sont nécessaires à l'initiation de l'expression de *Sf1*, crucial pour la formation des cellules progénitrices gonadiques et ainsi la formation de la gonade bipotentielle **(Figure 4)**.

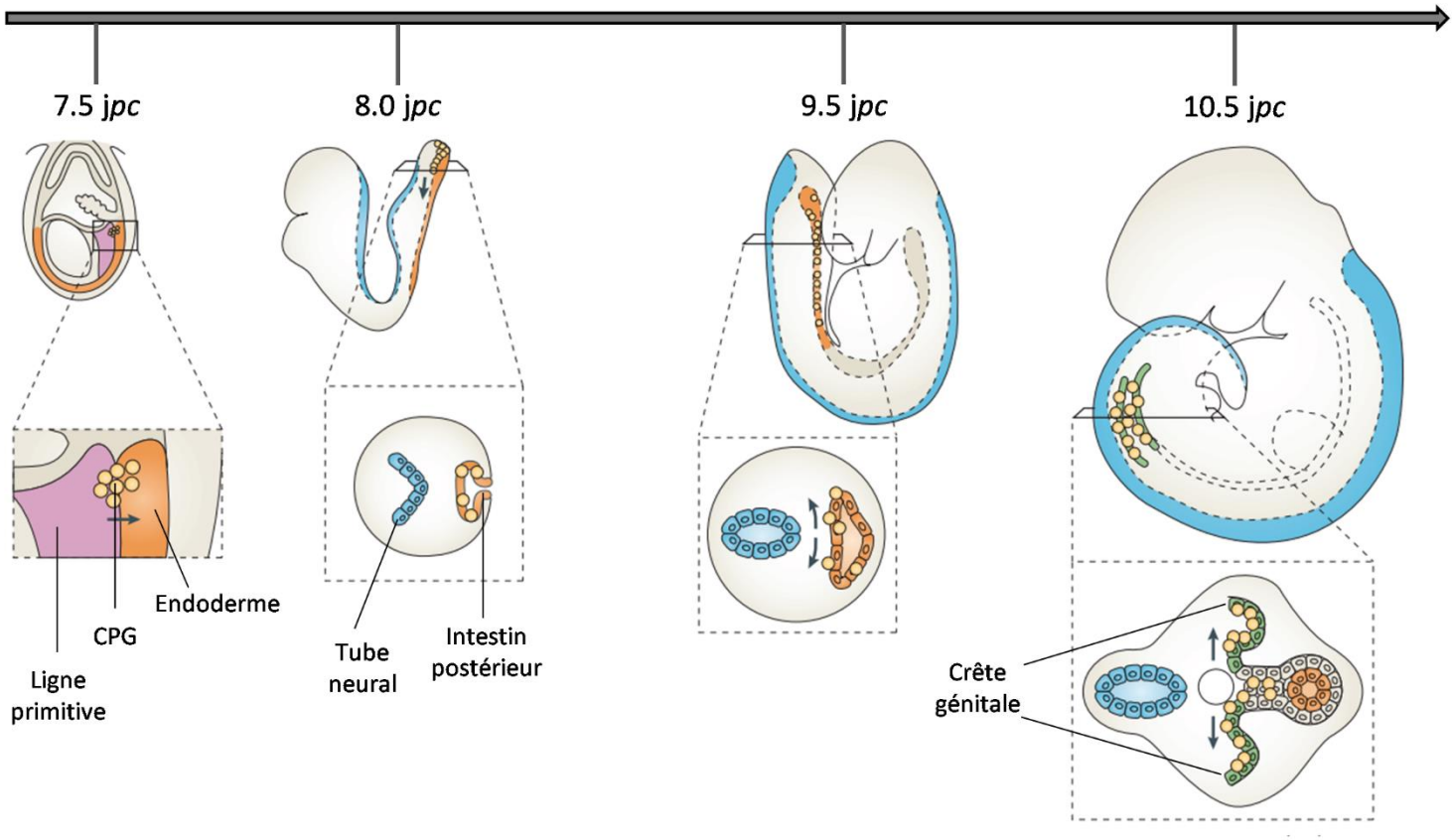
Par ailleurs, la signalisation à l'insuline est également nécessaire mais apparaît être plutôt requise pour la formation des cellules progénitrices surrénaliennes. En effet, une absence de glandes surrénales est observée chez des embryons n'exprimant plus les deux récepteurs clés de cette voie de signalisation INSR (Insulin receptor) et IGF1R (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor) (Pitetti *et al*, 2013) **(Figure 4)**.

En plus de réguler l'expression de SF1, *Six1* et *Six4* pourraient être nécessaires à la transition des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses **(Figure 4)**. Cette étape est importante puisqu'elle permet à ces cellules de coloniser toute la gonade. Dans les crêtes génitales délétées de *Six1* et *Six4*, aucun précurseur exprimant SF1 n'est détecté dans la région mésenchymateuse (Fujimoto *et al*, 2013).

Parallèlement à la formation de la gonade bipotentielle à partir de précurseurs exprimant SF1, les cellules germinales primordiales (CGP) vont venir coloniser les gonades. Celles-ci sont spécifiées au niveau des tissus extra-embryonnaires et vont devoir proliférer puis migrer jusqu'aux crêtes génitales.

C) Spécification et migration des CGP

La spécification des CGP est un processus qui débute précocement vers 6 j*pc* chez la souris, soit bien avant le début de formation des crêtes génitales. Des signaux paracrines provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire permettent à de proches cellules du mésoderme d'acquérir la capacité de devenir des CGP (Ewen & Koopman, 2010; Richardson & Lehmann, 2010).



<u>Figure 5.</u> Migration des CGP puis colonisation des crêtes génitales chez la souris.
Après leur spécification engagée dès 6 *jpc*, les CGP commencent à migrer de la ligne primitive vers l'endoderme à 7.5 *jpc*. L'invagination de l'intestin à partir de 8 *jpc* entraine les CGP à l'intérieur de l'embryon où elles se retrouveront dans le mésentère dorsal à 9.5 *jpc*. Elles vont finalement se séparer en deux populations pour aller migrer latéralement et ainsi coloniser les crêtes génitales dès 10.5 *jpc*.
Adapté de Richardson & Lehmann, 2010.

Il a ainsi pu être montré que des membres de la famille des BMP étaient nécessaires à la spécification des CGP. C'est le cas de BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) et de BMP8b (Bone Morphogenetic Protein 8b), dont la délétion conduit à l'absence totale de CGP (Lawson *et al*, 1999; Ying *et al*, 2000). La délétion de gènes codant pour des signaux intracellulaires de cette voie BMP (SMAD1 (SMAD family member 1) ou SMAD5 (SMAD family member 5)) a quant à elle pour conséquence une réduction du nombre des CGP ainsi qu'une perturbation de la formation de l'allantoïde (Chang & Matzuk, 2001; Tremblay *et al*, 2001).

Les cellules du mésoderme étant prédisposées à former des cellules somatiques, la spécification des CGP consiste aussi en la répression du programme transcriptionnel somatique, la ré-acquisition du potentiel de pluripotence ainsi que la reprogrammation épigénétique à l'échelle du génome. L'expression du répresseur transcriptionnel *Blimp1* (B Lymphocyte Induced Maturation Protein 1), encore appelé *Prdm1* (PR Domain zinc finger protein 1) dans les cellules du mésoderme destinées à former la lignée germinale permet la répression des gènes somatiques (Ohinata *et al*, 2005). De plus, *Prdm14* (PR Domain zinc finger protein 14) qui présente une expression spécifique du lignage germinal, exerce-lui aussi un rôle mais de façon indépendante à *Prdm1*. En effet, bien que la suppression du programme somatique soit observée, les embryons déficients pour *Prdm14* sont incapables de retrouver le potentiel de pluripotence et d'initier la reprogrammation épigénétique associée (Yamaji *et al*, 2008). Les trois évènements critiques de la spécification des CGP nécessitent donc l'expression de BLIMP1/PRDM1 et de PRDM14.

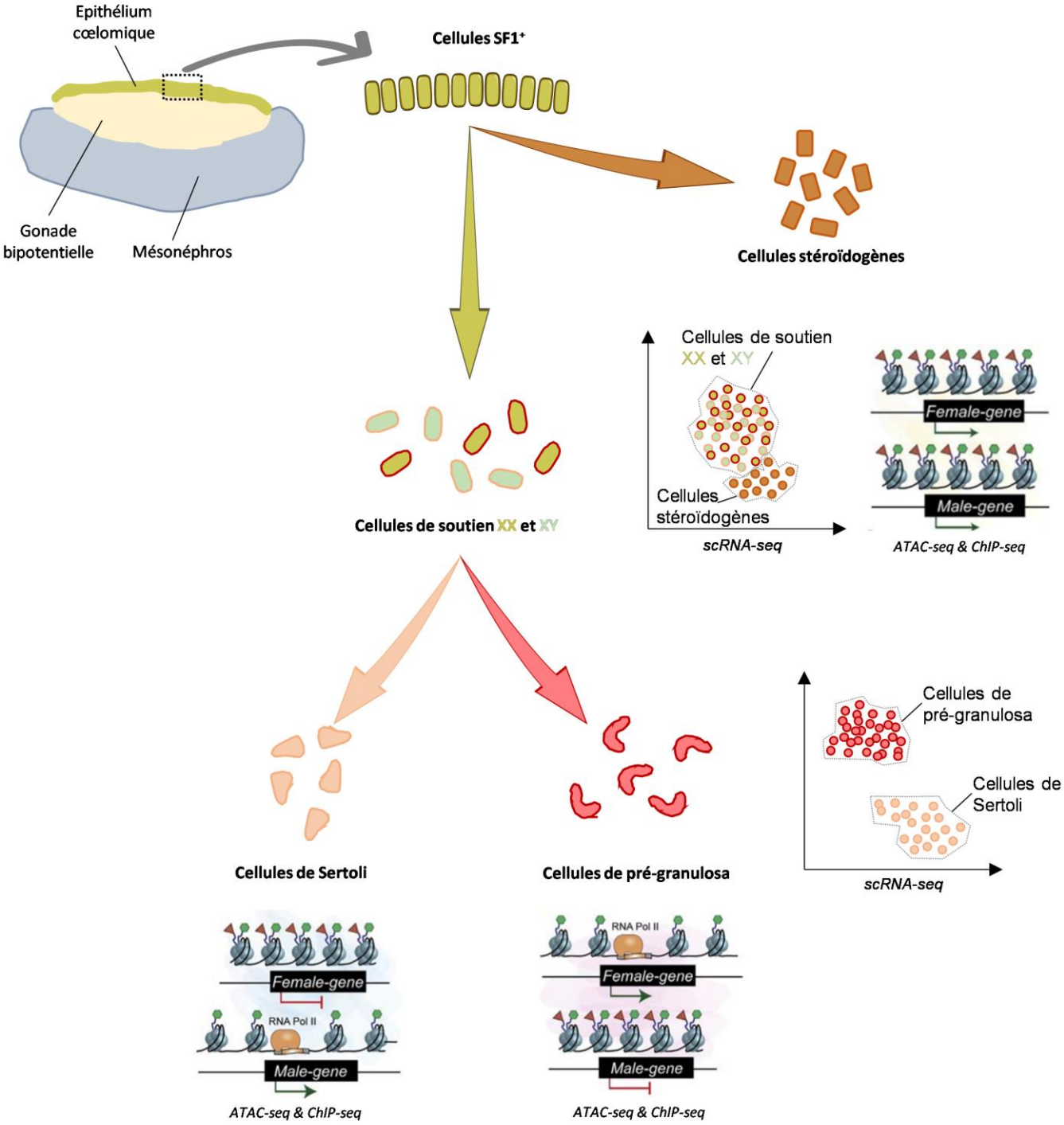
Après leur spécification, les CGP vont débuter un long processus de migration jusqu'à la colonisation des crêtes génitales **(Figure 5)**. Initialement localisées au niveau de la ligne primitive à la base de l'allantoïde, elles commencent à migrer à 7.5 j*pc* vers l'endoderme sous-jacent, à l'origine de l'intestin postérieur (Clark & Eddy, 1975). L'invagination de cet intestin entraine les CGP à l'intérieur de l'embryon où elles continuent leur migration vers le mésentère dorsal à 9-9.5 j*pc* puis se séparent en deux groupes pour aller coloniser les crêtes génitales en formation entre 10.5 et 12.5 j*pc* (Molyneaux *et al*, 2001). Une perturbation de la migration des CGP peut avoir des conséquences sur la fertilité future des individus si elles ne parviennent pas à coloniser les gonades bipotentielles. Mais cela peut aussi être à l'origine du développement de tumeurs de cellules germinales extra-gonadiques dans le cas d'une migration vers des sites ectopiques (Richardson & Lehmann, 2010).

Ce mécanisme de migration est donc finement régulé. Cela passe principalement par le facteur kit ligand (KL), connu aussi comme le facteur steel, le stem cell factor ou encore le facteur de croissance des mastocytes. L'expression de KL est détectée dès 7.5 j*pc* dans des cellules au niveau de l'allantoïde puis à 8.5 j*pc* dans les cellules de l'endoderme viscéral mais aussi dans le diverticule de l'intestin postérieur. A 10 j*pc*, son expression est absente de l'épithélium de l'intestin mais est retrouvée dans les tissus entourant les CGP (Gu *et al*, 2009). Des cellules exprimant KL entourent donc les CGP depuis leur apparition dans l'allantoïde jusqu'à la colonisation des crêtes génitales. L'analyse d'embryons de souris déficients de KL a notamment mis en évidence un nombre réduit de CGP dès 7.5 j*pc* illustrant ainsi son importance avant même la colonisation de l'intestin postérieur (Gu *et al*, 2009). L'absence de KL induit également une localisation ectopique des CGP (Runyan *et al*, 2006). Kit ligand est donc nécessaire pour leur prolifération et leur migration vers l'intestin postérieur.

Cette importance cruciale de KL passe par l'interaction avec son récepteur, c-Kit exprimé par les CGP. Ce proto-oncogène est localisé sur le locus W (dominant spotting) dont la délétion empêche la prolifération des CGP au moment de leur passage de l'allantoïde à l'endoderme sous-jacent. Cela a pour conséquence, qu'à 10.5 j*pc*, les crêtes génitales sont dépourvues de cellules germinales (Buehr *et al*, 1993b).

L'implication d'autres facteurs dans la migration des CGP a également été étudiée et notamment celles des composants de la matrice extra-cellulaire. Il est en effet apparu que de la fibronectine est retrouvée dans la région mésentérique de l'intestin et qu'elle peut être utilisée par les CGP lors de leur migration (Alvarez-Buylla & Merchant-Larios, 1986). L'adhésion des CGP à la fibronectine ainsi qu'au collagène IV et à la laminine a par la suite été étudiée. Une forte adhésion au collagène IV est observée avant, pendant et après la migration. En revanche, pour la fibronectine et la laminine, l'adhésion se fait principalement avant la migration (García-Castro *et al*, 1997). Il a de plus été observé que ces trois glycoprotéines, le collagène I et II ainsi que la tenascine-C sont présents tout au long du trajet des CGP (García-Castro *et al*, 1997; Soto-Suazo *et al*, 2004).

Chez la souris, la colonisation des crêtes génitales est aussi synonyme de modifications morphologiques et d'expression génique. Les cellules germinales deviennent ainsi facilement reconnaissables en adoptant une structure large et ronde (Donovan *et al*, 1986). Elles vont aussi rapidement inhiber l'expression des marqueurs des CGP (*Tnap* (Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase), *Ssea1* (Stage Specific Embryonic Antigen 1) et *Nanos3* (Nanos C2HC-type zinc finger 3)) pour acquérir une nouvelle signature génique avec *Gcna1* (Germ Cell Nuclear



<u>Figure 6.</u> Engagement des lignages cellulaires somatiques chez la souris.
Les cellules somatiques ont pour origine les cellules de l'épithélium cœlomique exprimant SF1 aussi appelées cellules progénitrices communes. Les cellules de soutien adopteront rapidement un destin différent de celui des cellules stéroïdogènes. Avant la détermination du sexe, ces cellules de soutien, qu'elles soient dans des gonades XX ou XY ont un profil transcriptomique identique mais aussi un paysage épigénétique similaire. Après la détermination du sexe, ces cellules se différencieront en cellules de Sertoli dans les gonades XY ou en cellules de pré-granulosa dans les gonades XX. Dès lors, elles adoptent des signatures transcriptomiques spécifiques au sexe. De même, leur paysage chromatinien devient aussi différent en fonctions des gonades XY ou XX.
Adapté de Garcia-Moreno et al., 2018 et Stévant et al., 2019. Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

Antigen 1), *Dazl* (Deleted in Azoospermia Like), *Gcl* (Germ Cell-Less) et *ERR-β* (Estrogen Related Receptor β) (Enders & May, 1994; Kimura *et al*, 1999; Mitsunaga *et al*, 2004; Saunders *et al*, 2003). Elles maintiennent néanmoins l'expression de certains gènes de pluripotence dont *Oct4* (Octamer-binding transcription factor 4) jusqu'à leur différenciation sexuelle (Schöler *et al*, 1989).

D) Précurseurs des différentes lignées somatiques des gonades

1. Les différents types de cellules somatiques

Contrairement aux cellules germinales qui ont une origine extra-embryonnaire, les cellules somatiques des gonades se différencient *in situ* et ont pour origine l'épithélium cœlomique ou le mésonéphros sous-jacent.

Les deux principaux types de cellules somatiques composant les gonades correspondent aux cellules de soutien originaires de l'épithélium cœlomique et aux cellules stéroïdogènes ayant pour origine à la fois l'épithélium cœlomique et le mésonéphros (Nef *et al*, 2005; Stévant *et al*, 2018; DeFalco *et al*, 2011; Kumar & DeFalco, 2018; Ademi *et al*, 2022) **(Figure 6)**. Au cours du développement gonadique, ce sont les cellules de soutien qui vont définir le devenir des autres types cellulaires constituant un testicule ou un ovaire (Stévant *et al*, 2019, 2018).

Les cellules endothéliales constituent un troisième type cellulaire qui a pour origine le mésonéphros (Combes *et al*, 2009).

2. Les précurseurs des cellules de soutien

Les cellules de soutien sont originaires des progéniteurs communs exprimant SF1 présents dans l'épithélium cœlomique. La spécification de ces progéniteurs a pu être caractérisée de façon optimale, chez la souris, ces dernières années grâce à l'essor du séquençage haut-débit et notamment le séquençage d'ARN sur cellules uniques (single-cell RNA-sequencing ou scRNA-seq). Ainsi, il a récemment été démontré que les précurseurs des cellules de soutien (futures cellules de Sertoli chez les XY et futures cellules de la granulosa chez les XX) mais aussi ceux de certaines cellules stéroïdogènes (cellules interstitielles chez les XY et de la thèque chez les XX) ont pour origine commune les cellules progénitrices précoces exprimant SF1 (Stévant *et al*, 2019, 2018). Les futures cellules de soutien sont les

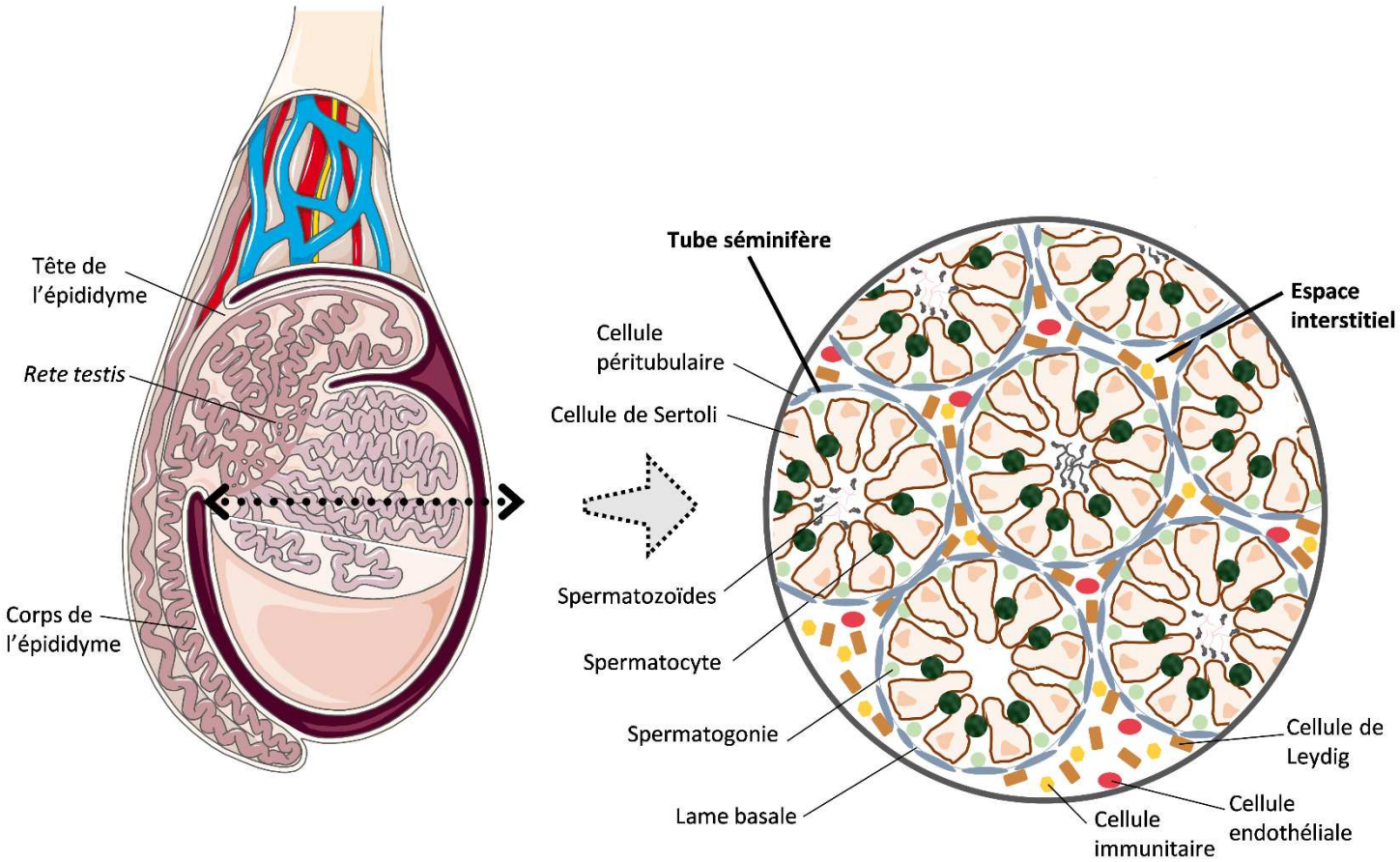
premières à adopter un destin divergent et s'engager ainsi vers leur voie de différenciation. A ce stade, elles ne présentent pas encore de signature transcriptomique différentielle, spécifique au sexe **(Figure 6)**. Ce dimorphisme apparait uniquement après leur spécification en cellules de Sertoli vers 11.5 j*pc* ou en cellules de la pré-granulosa vers 12.0 j*pc* (Hiramatsu *et al*, 2009; Harikae *et al*, 2013). Après cet engagement, les cellules de pré-granulosa maintiennent le statut bipotentiel plus longtemps que les cellules de pré-Sertoli (Stévant *et al*, 2019, 2018).

Une autre technique dont l'essor est constant ces dernières années a permis l'étude de l'évolution du paysage chromatinien au cours de la spécification des cellules de soutien : l'ATAC-seq (Assay for Transposable-Accessible Chromatin - sequencing). Elle permet, à un stade donné, de localiser les régions ouvertes de la chromatine pouvant donc être potentiellement accessibles à des facteurs de transcription ou à l'ARN polymérase II. En combinaison avec du ChIP-seq (Chromatin ImmunoPrecipitation – sequencing) pour une marque épigénétique active (H3K27Ac : acétylation de la lysine 27 de l'histone 3, retrouvée au niveau de promoteurs ou de régions régulatrices activés), Garcia-Moreno et collaborateurs ont ainsi pu comparer le paysage chromatinien avant et après spécification des cellules de soutien. A 10.5 j*pc*, la majorité des régions ouvertes de la chromatine (NDR : Nucleosome Depleted Region) sont communes entre les cellules progénitrices XX et XY (Garcia-Moreno *et al*, 2019). Ces cellules sont donc non seulement indistinguables d'un point de vue transcriptionnel (Stévant *et al*, 2019; Mayère *et al*, 2022) mais elles partagent aussi un paysage chromatinien similaire. A 13.5 j*pc*, le nombre de NDR partagées entre les deux sexes diminue au profit de l'acquisition de NDR spécifiques au type cellulaire. Cette augmentation des NDR spécifiques permettra l'activation des programmes transcriptionnels conduisant à la différenciation des cellules de Sertoli chez le mâle ou des cellules de la pré-granulosa chez la femelle (Garcia-Moreno *et al*, 2019) **(Figure 6)**. Par ailleurs, à 10.5 j*pc*, les régions ouvertes de la chromatine portant la marque H3K27Ac sont principalement enrichies autour des gènes promouvant la différenciation des cellules de granulosa (Garcia-Moreno, 2019). Ainsi, à ce stade, l'accessibilité est favorisée autour de ces gènes. L'expression du déterminant sexuel permettra ensuite de modifier cette accessibilité.

Au sein de la population des cellules stéroïdogènes, l'engagement vers la différenciation mâle se fait aussi avant celui vers la voie femelle. En effet, dans la gonade XY, le destin des cellules est rapidement déterminé afin qu'elles se différencient en cellules de Leydig. En

revanche, dans la gonade XX, les cellules de la thèque ne s'engagent qu'une fois que les cellules de pré-granulosa ont terminé leur différenciation (Stévant *et al*, 2019, 2018).

Une fois les gonades bipotentielles formées, des cascades génétiques vont permettre la spécification des différents types cellulaires gonadiques. L'ensemble des mécanismes cellulaires associés à ces cascades génétiques vont conduire à la différenciation puis le développement d'un ovaire ou d'un testicule.



<u>Figure 7.</u> Morphologie du testicule adulte.
Un testicule adulte est composé de deux compartiments. Le premier correspond aux tubules séminifères qui enferment les cellules de Sertoli étroitement associées aux cellules germinales à différents stades de différenciation (spermatogonie, spermatocyte, spermatozoïdes). Le cytoplasme des cellules de Sertoli entoure les cellules germinales tout au long de leur développement afin de leur fournir un environnement favorable. Les cellules péritubulaires myoïdes entourent les tubules. Le deuxième compartiment, l'espace interstitiel, comprend les cellules de Leydig responsables de la stéroïdogenèse, à l'origine des hormones sexuelles mâles. Les cellules endothéliales et les cellules immunitaires font également partie de cet espace.
Les spermatozoïdes formés dans les tubules séminifères puis libérés dans la lumière transitent vers la tête de l'épididyme *via* le *rete testis*. Ils poursuivent ensuite leur trajet dans l'épididyme en passant par le corps puis la queue.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

CHAPITRE II
La différenciation testiculaire

Le testicule est composé de deux compartiments dans lesquels sont répartis différents types cellulaires **(Figure 7)** :

- Les tubes séminifères comprennent les cellules de soutien ou cellules de Sertoli ainsi que les cellules germinales tout au long de leur processus de différenciation jusqu'à la formation des spermatozoïdes à partir de la puberté. Ces tubules sont isolés des cellules environnantes dès leur formation grâce à une lame basale déposée par les cellules myoïdes péritubulaires en coopération avec les cellules de Sertoli.
- Le compartiment interstitiel correspond au tissu entre chaque tubule séminifère. Il est composé des cellules de Leydig responsables de la stéroïdogenèse et donc de la production d'hormones testiculaires, ainsi que des cellules endothéliales et des cellules immunitaires.

Au cours du développement gonadique, la différenciation testiculaire permettra donc la mise en place de ces différents types cellulaires et de ces deux compartiments selon des mécanismes cellulaires finement régulés génétiquement.

A) Mécanismes cellulaires associés à la formation d'un testicule

La formation d'un testicule peut être divisée en trois étapes majeures : (i) la spécification du lignage des cellules de Sertoli ; (ii) la compartimentalisation du testicule ; et (iii) l'élongation des cordons testiculaires.

1. Spécification du lignage des cellules de Sertoli

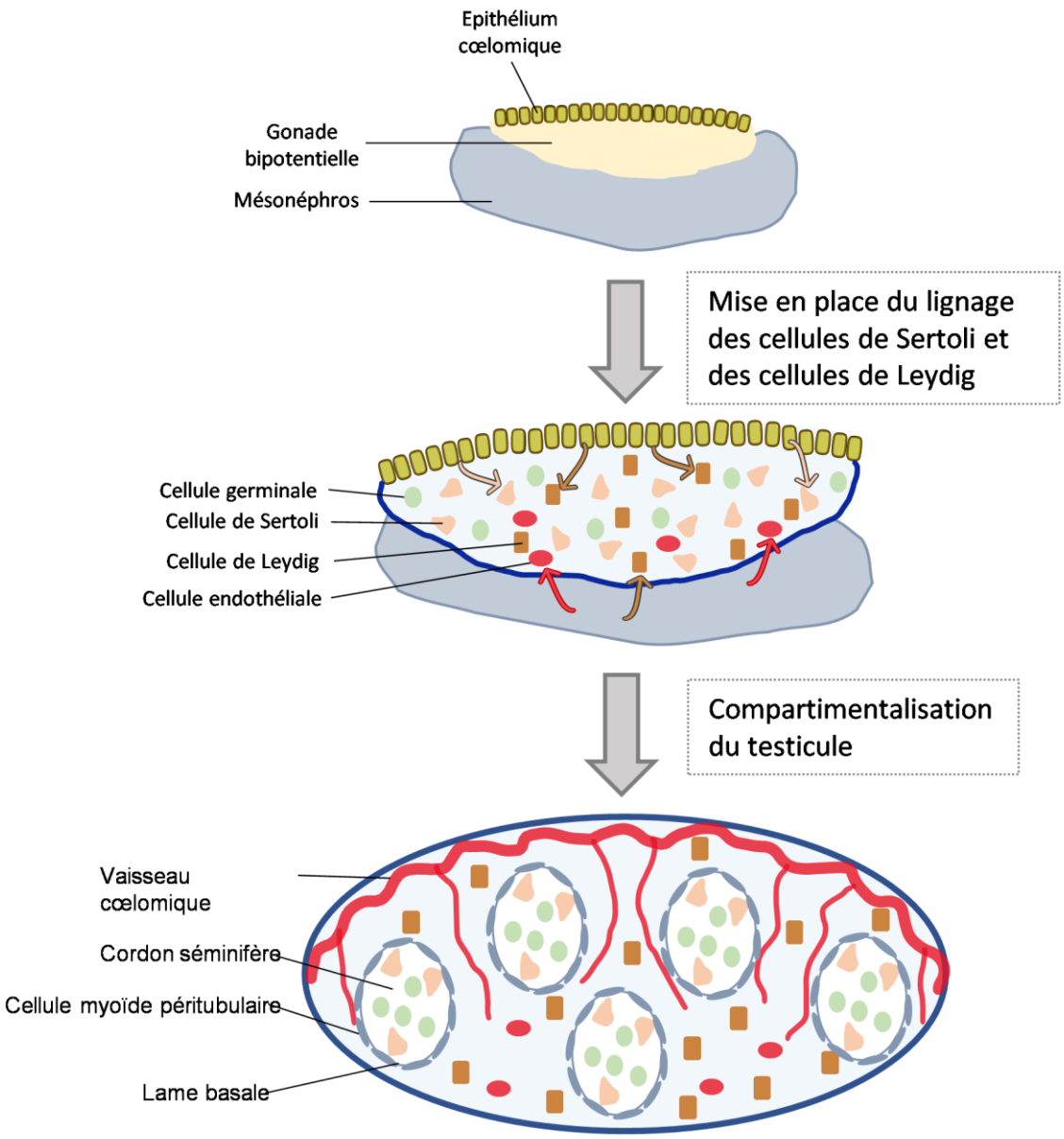
Dans le chapitre précédent, la caractérisation transcriptomique et épigénétique des précurseurs des cellules de soutien a été dévoilée (Garcia-Moreno *et al*, 2019; Stévant *et al*, 2019, 2018). Mais, les techniques récentes d'analyse haut-débit utilisées ne font que confirmer et affiner ce qui a été démontré dès 1998 grâce à des techniques de marquages cellulaires (Karl & Capel, 1998). L'équipe de Blanche Capel a en effet montré que certaines cellules de l'épithélium cœlomique migraient dans la gonade et pouvaient ensuite être observées dans les

cordons testiculaires en formation. Un double marquage avec un anticorps anti-AMH, un marqueur spécifique des cellules de Sertoli, a confirmé que ces cellules étaient bien devenues des cellules de Sertoli. De façon intéressante, les auteurs ont également pu observer qu'en se divisant, une seule cellule de l'épithélium pouvait contribuer aussi bien aux cellules de Sertoli qu'aux cellules de Leydig. Néanmoins, ces cellules n'ont la capacité de devenir des cellules de Sertoli qu'entre 11.25-11.5 j*pc*. Passé cette période, elles ne contribuent plus qu'aux cellules interstitielles (Karl & Capel, 1998).

En parallèle, les cellules de l'épithélium cœlomique vont entrer en prolifération. Alors que durant les premiers stades, la prolifération est faible et similaire dans les gonades des deux sexes, deux vagues de prolifération intensive seront ensuite observées au niveau de l'épithélium cœlomique des gonades XY. La première (11.25-11.5 j*pc*) concerne les cellules exprimant SF1, présentes au niveau de l'épithélium cœlomique ou sous-jacentes. Le traçage de ces cellules montre qu'elles vont présenter une position caractéristique des cellules de Sertoli, à savoir au niveau du bord intérieur de la lame basale des cordons testiculaires. La deuxième vague de prolifération (11.5-12 j*pc*) touche des cellules de l'épithélium n'exprimant pas SF1. Le suivi de ces cellules ne montre pas de localisation au niveau du bord intérieur de la lame basale (Schmahl *et al*, 2000). Cette étude confirme que la contribution de l'épithélium cœlomique au lignage des cellules de Sertoli a lieu pendant une période restreinte. Par ailleurs, il a été démontré que la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique est cruciale pour la différenciation testiculaire. En effet, lorsqu'on inhibe cette prolifération dans une fenêtre de temps bien précise, entre 10.5 et 11.5 j*pc*, la formation des cordons testiculaires ne se fait pas dans la plupart des gonades XY traitées (Schmahl & Capel, 2003).

Ainsi, chez la souris, des cellules de l'épithélium cœlomique qui prolifèrent de façon intense entre 10.5 et 11.5 j*pc* s'engagent dans le lignage des cellules de Sertoli. Cette prolifération au cours de cette fenêtre temporelle précise, est nécessaire à l'obtention d'un nombre suffisant de cellules de Sertoli pour permettre la formation des cordons séminifères. Par ailleurs, la prolifération spécifique aux gonades XY est liée au gène *SRY*, exprimé au niveau des cellules de l'épithélium cœlomique lui permettant de diriger leur prolifération (Schmahl *et al*, 2000; Sekido *et al*, 2004). Cela sera décrit plus en détails dans la **partie B)1.** de ce chapitre.

Il est apparu que deux molécules de signalisation, plutôt connues pour leur implication cruciale dans la différenciation ovarienne (décrite dans le **Chapitre III**), agissent également sur la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique : RSPO1 (R-Spondin 1) et WNT4 (WNT



<u>Figure 8.</u> Les évènements cellulaires de la différenciation testiculaire.
Juste après la détermination sexuelle, les cellules de l'épithélium cœlomique vont être spécifiées en cellules de pré-Sertoli ou en cellules de Leydig. Ces cellules d'origine épithéliale, tout comme les cellules de Leydig originaires du mésonéphros vont migrer à l'intérieur de la gonade en développement. Une fois ces deux lignages mis en place, les cellules de Sertoli vont se regrouper avec les cellules germinales afin de former les cordons séminifères. Les cellules de Leydig restent quant à elles dans l'espace interstitiel. La compartimentalisation est complète lorsque la lame basale est déposée par les cellules myoïdes péritubulaires. Parallèlement, la migration de cellules endothéliales, issues du mésonéphros, à la surface de la gonade va induire la formation du vaisseau cœlomique, autre caractéristique du développement testiculaire.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

family member 4). Ces protéines sont exprimées dans les deux sexes dès 11.25 j*pc* et activent la voie canonique de la β-caténine au niveau de la région cœlomique de façon plus importante chez les XY à 11.5 j*pc*. Les souris XY déficientes pour ces deux gènes ont une prolifération fortement diminuée conduisant au développement de testicules hypoplasiques. Ce défaut de prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique entraine en effet une réduction du nombre de cellules de pré-Sertoli exprimant *Sry*, et conduit donc à moins de cellules de Sertoli puis de cordons séminifères (Chassot *et al*, 2012). La voie RSPO1/WNT4/β-caténine a donc une importance dans le développement gonadique précoce.

2. Compartimentalisation du testicule

Lors de leur entrée dans la gonade après leur spécification, les cellules de Sertoli initient la formation des cordons testiculaires et ainsi la compartimentalisation du testicule. Comme indiqué précédemment, après 11.5 j*pc*, les cellules de l'épithélium cœlomique contribuent uniquement au lignage des cellules interstitielles (Karl & Capel, 1998). De façon parallèle à la contribution de l'épithélium cœlomique, le mésonéphros contribue également au lignage des cellules de Leydig (DeFalco *et al*, 2011; Kumar & DeFalco, 2018; Ademi *et al*, 2022) **(Figure 8)**.

Conjointement, une autre population cellulaire va contribuer aux différents lignages composant le testicule et de ce fait accentuer le processus de compartimentalisation. Cette population correspond aux cellules endothéliales, ayant pour origine le mésonéphros, qui migrent au sein des gonades XY entre 11.5 et 16.5 j*pc* (Combes *et al*, 2009). Des expériences de co-culture mésonéphros-gonade ont pu mettre en évidence que la migration de ces cellules n'a lieu qu'en présence de gonades XY (Martineau *et al*, 1997). Par ailleurs, la contribution de ces cellules à la compartimentalisation du testicule a pu être étudiée grâce à différents types d'expériences de culture organotypique. Lorsque des testicules sont cultivés en absence de mésonéphros ou avec un filtre placé entre les deux, des cordons testiculaires bien définis sont rarement observés. De ce fait, les testicules ne parviennent pas à se différencier correctement (Buehr *et al*, 1993a). La formation de cordons peut être observée lorsque la migration des cellules du mésonéphros est induite dans une gonade XX en la cultivant avec une gonade XY (Tilmann & Capel, 1999). Ces observations illustrent l'implication des cellules endothéliales dans le processus de compartimentalisation du testicule. Lorsque ces cellules endothéliales migrent depuis le mésonéphros, elles vont fragmenter les cordons testiculaires jusqu'à aller s'agréger sous l'épithélium cœlomique afin de former un plexus vasculaire interconnecté, le

vaisseau cœlomique, future artère testiculaire (Combes *et al*, 2009) **(Figure 8)**. La mise en place de la vascularisation est de ce fait une étape cruciale et constitue un des premiers signes visibles de la différenciation testiculaire.

La compartimentalisation est complète lorsque la lame basale est apposée, terminant ainsi la formation des cordons testiculaires et formant une barrière physique avec le tissu interstitiel **(Figure 8)**. Ce sont les cellules myoïdes péritubulaires qui sont à l'origine de ce dépôt de la lame basale et ce sous le contrôle de DHH (Desert Hedgehog) produit par les cellules de Sertoli. Au sein de gonades XY de souris déficientes pour *Dhh*, les cellules myoïdes péritubulaires ne sont pas observées et la lame basale est discontinue. Des cellules germinales sont ainsi observées en dehors des cordons et mélangées aux cellules de Leydig alors qu'elles en sont normalement isolées puisque localisées dans les cordons avec une lame basale continue (Clark *et al*, 2000; Pierucci-Alves *et al*, 2001). Cela montre que DHH est requis pour la différenciation des cellules myoïdes péritubulaires ainsi que pour le dépôt et l'organisation optimale de la lame basale. En l'absence de DHH, les cellules de Sertoli peuvent synthétiser cette lame basale mais l'absence des cellules myoïdes péritubulaires conduit à ce qu'elle reste discontinue. Néanmoins, alors que les cellules myoïdes péritubulaires dérivent des progéniteurs stéroïdogènes exprimant *Wnt5a* (Ademi *et al*, 2022), l'induction de l'expression de *Dhh* dans des gonades XX ne permet la différenciation que des cellules de Leydig (Barsoum *et al*, 2009). Un autre facteur que DHH pourrait donc être nécessaire à la différenciation des cellules myoïdes péritubulaires.

Chez la souris, la compartimentalisation du testicule se fait donc principalement entre 11.5 et 13.5 j*pc*. Alors que les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont encore dispersées dans la gonade XY en formation à 11.5 j*pc*, elles commencent à s'assembler pour former des groupes de cellules dès 12 j*pc*. Quelques heures plus tard, à 12.25 j*pc*, les cellules endothéliales commencent à être localisées entre les cordons testiculaires en cours de formation. Ensuite, à 12.5 j*pc*, ces cellules endothéliales sont à la fois présentes au niveau de l'interstitiel et sous l'épithélium cœlomique où viennent s'aligner une partie d'entre elles pour permettre la formation du vaisseau cœlomique (Combes *et al*, 2009). Enfin, à 13.5 j*pc*, le dépôt de la lame basale est presque complet signant la fin de la formation des cordons testiculaires (Pierucci-Alves *et al*, 2001).

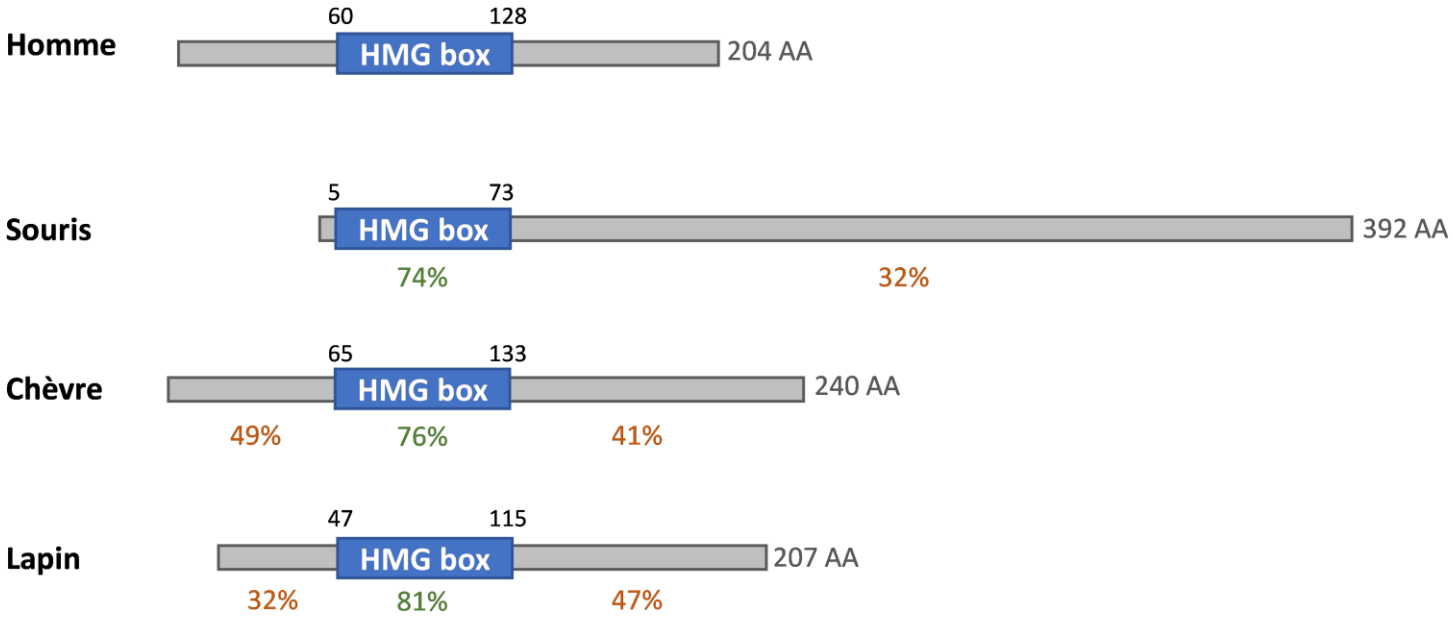
3. *Expansion des cordons testiculaires*

Cette troisième étape de la formation testiculaire est moins documentée mais semble nécessiter l'intervention des cellules de Leydig et la production d'activine A. En effet, la délétion conditionnelle de l'activine A (*Inhba* cKO) dans les cellules de Leydig chez la souris n'impacte pas la formation des cordons testiculaires mais conduit à ce qu'ils s'enroulent moins sur eux-mêmes et gardent leur forme circulaire initiale. Chez les souris contrôles, ce processus de circonvolution se traduit sur des coupes sagittales de testicule par un diamètre limité de chaque cordon et un grand nombre de cordons ainsi observable. En revanche, sur des coupes de testicules *Inhba* cKO, moins de cordons sont visibles et ils présentent un diamètre plus large. De plus, une forte diminution de la prolifération des cellules de Sertoli a pu être observée chez ces souris (Archambeault & Yao, 2010). Il apparait donc que la sécrétion d'activine A par les cellules de Leydig stimule la prolifération des cellules de Sertoli conduisant ainsi à l'expansion des cordons testiculaires puis à leur circonvolution.

4. *Formation du rete testis*

La mise en place du *rete testis* est elle aussi importante puisqu'elle permet la formation d'une connexion entre les tubules séminifères et les canaux efférents. Bien qu'observable dès 12.5 j*pc* chez la souris (Kulibin & Malolina, 2020), il n'a un rôle crucial qu'après la puberté en permettant le transfert des spermatozoïdes du testicule vers l'épididyme.

L'origine des cellules constituant le *rete testis* a pu être caractérisée très récemment, grâce à la technique de scRNA-seq. L'analyse des populations dérivants du lignage cellulaire exprimant SF1 a ainsi permis l'identification de deux populations qui étaient encore non caractérisées : les cellules de « type soutien » ou SLCs (Supporting-Like Cells) XY et XX. De par leur profil caractéristique, ces populations sont liées aux cellules ayant pour origine l'épithélium cœlomique, mais elles diffèrent des cellules de soutien par leur forte expression du gène *Pax8* (Paired box gene 8). L'étude de leur localisation montre qu'elles sont principalement situées dans la région cranio-dorsale du testicule en développement, zone correspondant au *rete testis*. De façon intéressante, certaines d'entre elles coexpriment SOX9 (SRY-box transcription factor 9) ou l'AMH, deux marqueurs des cellules de Sertoli, suggérant que cette population de cellules pourrait également contribuer aux cellules de soutien. La voie de signalisation WNT et en particulier WNT4, semble importante pour le développement optimal du *rete testis*. Une forte réduction du nombre de cellules exprimant PAX8, mais aussi de celles coexprimant



<u>Figure 9.</u> Comparaison des séquences protéiques de SRY.
La localisation de l'HMG box et la taille des protéines sont issues des données de Uniprot (https://www.uniprot.org/). Les pourcentages indiqués correspondent à l'homologie des parties N- ou C-terminales et de l'HMG box des séquences chez la souris, la chèvre et le lapin par rapport à la séquence de l'Homme. Ces homologies ont été obtenues par comparaison des séquences avec l'outil Blast de NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

l'AMH, a en effet été observée dans les testicules de souris déficientes pour *Wnt4*. Ces cellules étaient par ailleurs dispersées à la jonction avec le mésonéphros mais ne se rassemblaient pas au niveau de la région de formation du *rete testis* comme chez les individus contrôles (Mayère *et al*, 2022).

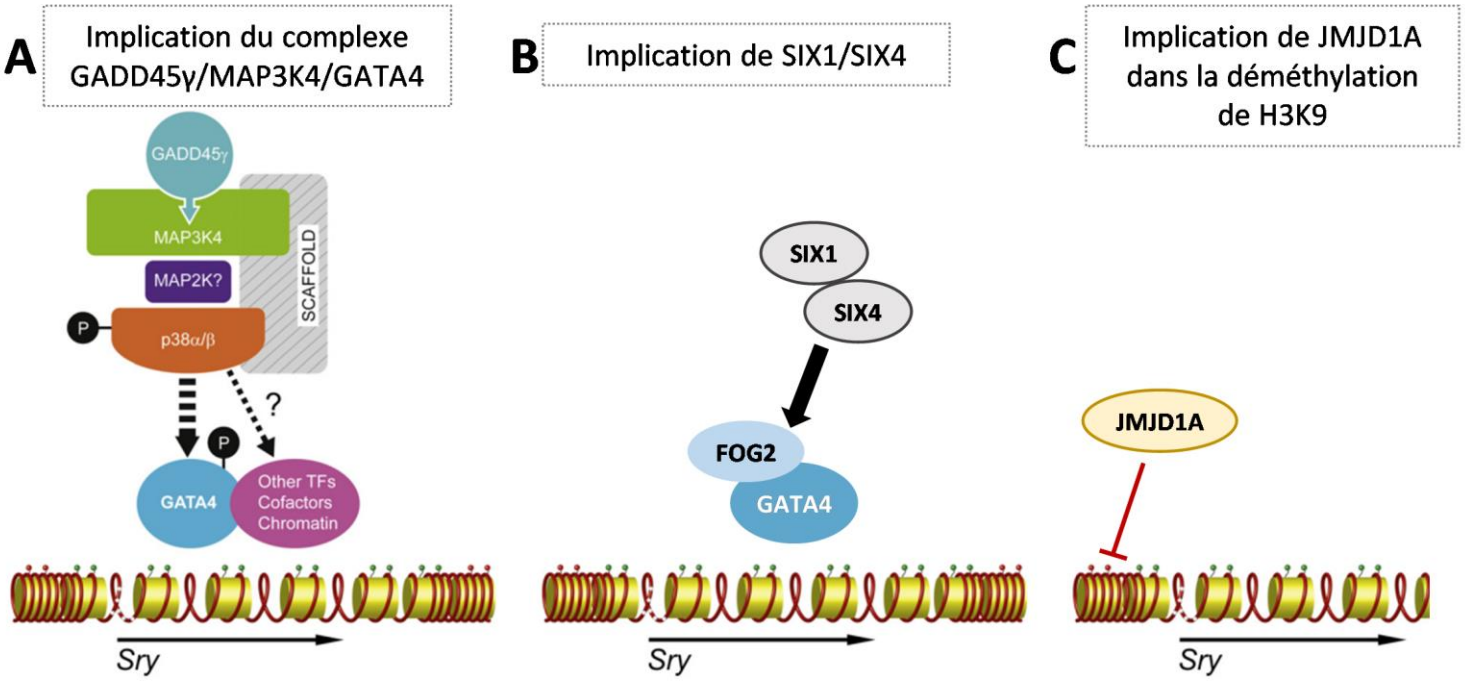
L'ensemble des mécanismes cellulaires aboutissant à la formation d'un testicule fonctionnel, capable de former des gamètes et de sécréter des hormones est contrôlé par toute une cascade génétique aussi bien dans les cellules germinales que dans les cellules de Sertoli. Tout ceci est déclenché par l'expression du facteur déterminant du testicule (TDF ou Testis Determining Factor).

B) Facteurs génétiques contrôlant la différenciation testiculaire

1. Le facteur déterminant du testicule

Chez la plupart des mammifères (chromosomes sexuels XX/XY), le facteur déterminant du testicule est le gène *SRY* (Sex-determining Region of the Y chromosome) porté par le chromosome Y. L'analyse d'hommes 46, XX avec des translocations de fragments du chromosome Y sur l'un des chromosomes X a permis son identification en 1990 (Sinclair *et al*, 1990). La même année, la caractérisation de mutation au sein de *SRY* chez des femmes XY a permis de confirmer son rôle de facteur déterminant du testicule (Berta *et al*, 1990).

Chez l'humain, l'analyse du transcrit de *SRY* a révélé qu'il est composé d'un seul exon dans lequel se trouve le motif de liaison à l'ADN (acide désoxyribonucléique) de type boite HMG (High Mobility Group) (Hacker *et al*, 1995) et qu'il code pour une protéine de 204 acides aminés (Clepet *et al*, 1993). Contrairement aux parties N- et C-terminales, la boite HMG est très bien conservée au cours de l'évolution (Pamilo & O'Neill, 1997) **(Figure 9)**. Il a par ailleurs pu être montré que la fixation de SRY à l'ADN est cruciale à la différenciation testiculaire. L'analyse de certains variants de SRY conduisant à des dysgénésies gonadiques chez l'humain a révélé que certaines mutations modifiaient l'affinité de liaison de SRY ainsi que sa capacité de flexion de l'ADN (Harley *et al*, 1992; Mitchell & Harley, 2002; Pontiggia *et al*, 1994; Schmitt-Ney *et al*, 1995).



<u>Figure 10.</u> Régulation de l'expression de *Sry* chez la souris.
(**A**) Dans les cellules de soutien, GADD45γ a pour rôle d'activer la protéine kinase MAP3K4. Celle-ci pourra alors phosphoryler p38. Ce complexe entraînera ensuite l'activation de GATA4 nécessaire à l'induction de *Sry*. (**B**) D'autres facteurs sont également impliqués dans le maintien de l'expression de *Sry*. SIX1/SIX4 activent ainsi le complexe GATA4/FOG2. (**C**) D'un point de vue épigénétique, la déméthylase JMJD1A inhibe la méthylation de H3K9 favorisant ainsi l'activité du promoteur de *Sry*.
Adapté de Warr et al., 2012.

Comme évoqué dans la **partie A)1.** de ce chapitre, SRY induit la prolifération spécifique du mâle des cellules de l'épithélium cœlomique destinées à devenir des cellules de Sertoli (Schmahl *et al*, 2000). Il permettra ensuite d'induire, dans ces cellules, l'expression de l'un de ces gènes cibles, le gène *SOX9*, qui dirigera la différenciation testiculaire (Barrionuevo *et al*, 2006; Vidal *et al*, 2001).

a. Régulation de l'expression de SRY

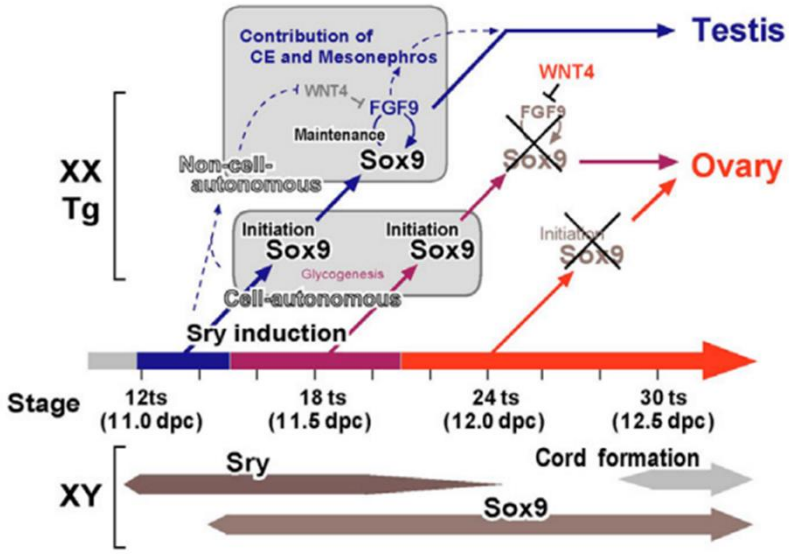
Du fait de l'implication critique de SRY dans la détermination testiculaire, notamment via l'initiation de l'expression de *Sox9* qui est rapidement détectée dans les cellules exprimant SRY (Sekido *et al*, 2004; Wilhelm *et al*, 2005), divers facteurs sont impliqués dans le contrôle de son expression lui permettant ainsi d'exercer ses fonctions.

L'un de ces régulateurs correspond au complexe composé de GADD45γ (Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene family 45 gamma), MAP3K4 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4) et GATA4 **(Figure 10A)**.

Le gène *Gadd45γ* est exprimé dans les gonades des deux sexes dès 11.5 j*pc* chez la souris puis sera maintenu uniquement dans les gonades XY jusqu'à la formation des cordons testiculaires. Les souris mutantes pour ce gène présentent une diminution de l'expression globale de *Sry* ainsi qu'un nombre réduit de cellules de pré-Sertoli exprimant *Sry* (Warr *et al*, 2012).

L'implication de MAP3K4 a été mise en évidence grâce à l'étude d'embryons murins présentant des gonades ressemblant à des testicules mais dépourvus de cordons. Chez ces embryons, la substitution d'un seul nucléotide au sein du gène *Map3k4* conduisant à la formation d'une protéine tronquée n'ayant plus le domaine critique d'action pour la MAP kinase a pu être détectées. Une forte diminution de la prolifération dans la région cœlomique associée à une forte réduction de l'expression de *Sry* ont aussi pu être observées (Bogani *et al*, 2009). MAP3K4 et sa capacité de phosphorylation sont donc importants pour la prolifération de l'épithélium cœlomique et l'expression de *Sry*. L'induction de l'expression de *Map3k4* chez les souris *Gadd45γ*$^{-/-}$ permet la restauration des anomalies testiculaires (Warr *et al*, 2012).

Enfin, GATA4 agit avec son cofacteur *FOG2* (FOG family member 2). Les souris déficientes pour *Fog2* ont une diminution significative des niveaux de transcrits de *Sry* dans les gonades XY entrainant un développement testiculaire anormal avec une absence de cordons (Tevosian *et al*, 2002). FOG2 joue aussi un rôle important chez l'humain puisque des mutations faux sens ont pu être identifiées chez des patients 46, XY atteints de dysgénésie gonadique.



<u>Figure 11.</u> Fenêtre critique d'action de SRY pour la différenciation testiculaire chez la souris.
Si l'expression de *Sry* est induite à 11 j*pc*, les niveaux de *Sox9* seront suffisants pour permettre l'expression de *Fgf9* et garantir ainsi le développement testiculaire.
Si cette expression est induite vers 11.5 j*pc*, *Sox9* s'initie mais n'est pas suffisamment exprimé pour induire *Fgf9*. L'expression de *Wnt4* n'est donc pas réprimée conduisant au développement d'un ovaire. En revanche, lorsque *Sry* est induit à 12 j*pc*, il est incapable de permettre l'expression de *Sox9*. Cela conduit donc à un développement ovarien.
Issu de Hiramatsu et al., 2009.

L'analyse de la protéine mutante a révélé que FOG2 ne pouvait plus interagir avec GATA4 (Bashamboo *et al*, 2014).

Pour résumer, il apparait donc que GADD45ɣ active la kinase MAP3K4 dans les précurseurs des cellules de soutien qui pourra ainsi phosphoryler p38. Ce module entrainera par la suite l'activation directe ou indirecte de GATA4, qui en coopération avec FOG2, pourra induire l'expression de *Sry* **(Figure 10A)**.

Conjointement au module GADD45ɣ/MAP3K4/p38, d'autres gènes agissent de façon à ce que le niveau d'expression de *SRY/Sry* soit suffisant pour initier la voie de différenciation mâle **(Figure 10B)**. En plus de leur rôle sur la croissance de la gonade bipotentielle, *Six1* et *Six4* sont aussi impliqués indirectement dans la stimulation de l'expression de *Sry*. Ils sont en effet capables de réguler positivement l'expression de *Fog2* qui pourra à son tour, aller réguler *Sry* (Fujimoto *et al*, 2013).

L'expression de *Sry* est également contrôlée par des mécanismes épigénétiques. Cette régulation a notamment été mise en évidence par l'analyse de souris déficientes pour une histone déméthylase codée par *Jmjd1a* (Jumonji domain containing 1A). La majorité des souris XY n'exprimant plus ce gène présente une inversion sexuelle avec soit le développement d'un ovaire et d'un testicule, soit de deux ovaires. L'étude des signaux de H3K9me2 (bi-méthylation de la lysine 9 de l'histone 3) chez les souris *Jmjd1a*$^{-/-}$ montre une augmentation de leur intensité au niveau du locus de *Sry* conduisant à la diminution de son expression mais pas de changement au niveau de *Sox9* (Kuroki *et al*, 2013). La déméthylation de H3K9 médiée par JMJD1A spécifiquement au niveau du locus de *Sry* est donc nécessaire à son expression **(Figure 10C)**.

b. Expression et cibles de SRY

Chez la souris, *Sry* présente un pic d'expression au moment de la détermination du sexe puis disparait (Koopman *et al*, 1990; Hacker *et al*, 1995; Bullejos & Koopman, 2001). Bien qu'il soit exprimé pendant 48 heures (10.5-12.5 j*pc*), des travaux ont pu démontrer que sa fenêtre d'action était en réalité plus courte **(Figure 11)**. La génération d'un modèle de souris transgéniques permettant l'induction de l'expression de *Sry* à un temps donné suite à un choc de température a ainsi permis l'identification d'une fenêtre critique de six heures. Lorsque l'expression est induite dans des crêtes génitales XX collectées à environ 11 j*pc*, l'expression de *Sox9* est détectée après six heures de culture puis maintenue permettant ainsi la formation des cordons. A ce stade, l'induction de *Sry* conduit à des profils d'expression spécifiques du mâle avec une forte expression de *Fgf9* (Fibroblast Growth Factor 9) alors que *Wnt4* est

diminué. Lorsque l'induction a lieu dans des crêtes génitales XX collectées à environ 11.5 j*pc*, l'expression de *Sox9* débute mais diminue rapidement et n'est plus détectable après 24h de culture. Ce défaut de maintien de l'expression de *Sox9* conduit à l'absence d'augmentation de *Fgf9* et de diminution de *Wnt4*. Ces deux gènes ne sont ainsi pas régulés selon le profil spécifique au mâle. En collectant les crêtes génitales à 12 j*pc*, aucune expression de *Sox9* n'est détectée. C'est donc entre 11 et 11.5 j*pc* que l'expression de *Sry* est cruciale afin de pouvoir induire une expression suffisante de *Sox9* qui pourra être maintenue lors de la différenciation testiculaire (Hiramatsu *et al*, 2009).

Cette expression transitoire n'est retrouvée que chez la souris puisque chez les autres espèces, l'expression de *SRY* présente aussi un pic au moment de la détermination du sexe mais elle sera ensuite maintenue jusqu'à l'âge adulte (Clepet *et al*, 1993; Daniel-Carlier *et al*, 2013; Díaz-Hernández *et al*, 2008; Montazer-Torbati *et al*, 2010).

La mauvaise conservation de la protéine SRY nécessite la génération d'un anticorps spécifique à chaque espèce rendant ainsi difficile l'étude de sa localisation et de ces cibles. Néanmoins, en couplant la protéine humaine ou murine au gène rapporteur *LacZ*, des travaux ont pu montrer qu'elles étaient retrouvées dans le noyau des cellules. De cette façon les auteurs ont également pu identifier dans la protéine murine une région riche en glutamine et histidine qui lui confère un rôle d'activateur transcriptionnel (Dubin & Ostrer, 1994). La création d'un anticorps spécifique à la protéine humaine a confirmé la présence de SRY dans le noyau des cellules de Sertoli en période fœtale et jusqu'à l'âge adulte (Salas-Cortes *et al*, 1999).

Chez la souris, le seul anticorps dont la spécificité est reconnue (Wilhelm *et al.*, 2005 ; Bradford, Wilhelm and Koopman, 2008) a pu être utilisé pour essayer de déterminer les cibles de SRY. En ne retenant que les gènes exprimés au même niveau que lui, les auteurs ont ainsi identifié que *Cbln4* (Cerebellin 4 precursor) était une cible de SRY. Comme pour *Sox9*, son expression augmente fortement dans les gonades XY après la détermination sexuelle (Bradford *et al*, 2009). Il a également été décrit que SOX9 et SRY partagent un grand nombre de cibles avec notamment des gènes impliqués dans la différenciation testiculaire tels que *Ptgds* (Prostaglanin D2 synthase), *Dhh* et *Cyp26b1* (Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1) (Li *et al*, 2014).

Parallèlement à ce rôle activateur dans le testicule, SRY présente également un rôle de répresseur transcriptionnel. Certaines de ces cibles sont en effet des gènes nécessaires au développement ovarien avec par exemple, *Fst* (Follistatin) et *Bmp2* (Bone Morphogenetic Protein 2) (Li *et al*, 2014). Cette activité de répresseur pourrait passer par sa capacité de fixation

avec KRAB-O (Krüppel-Associated Box Only) permettant ainsi le recrutement de KAP1 (KRAB-Associated Protein 1). Cette dernière pourra ensuite mobiliser des enzymes de désacétylation ou des histones méthyltransférases afin de changer l'état de la chromatine et ainsi empêcher l'activation de certains gènes (Oh *et al*, 2005; Peng *et al*, 2009). Il a par ailleurs été suggéré que SRY pouvait inhiber la voie WNT/β-caténine, importante pour la différenciation ovarienne (voir le **paragraphe B)1.** du **chapitre II**) via une interaction protéine-protéine avec la β-caténine (Bernard *et al*, 2008).

SRY agit donc aussi bien en tant qu'activateur transcriptionnel que répresseur transcriptionnel. Ces deux fonctions lui permettent à la fois d'activer la voie de différenciation mâle tout en inhibant la voie femelle. Nous verrons plus loin qu'un mécanisme inverse existe aussi dans l'ovaire. Cette inhibition réciproque sera maintenue tout au long de la vie par différents gènes dans les gonades des deux sexes.

c. Déterminants testiculaires chez les vertébrés

Chez la plupart des mammifères, c'est donc le gène *SRY* qui est le facteur déterminant du testicule. Mais chez certaines espèces ne l'expriment pas ou bien chez les vertébrés non mammaliens, c'est un autre gène qui a cette fonction. Il a en effet été décrit que chez deux espèces de rongeurs (*Tokudaia osimensis* et *T.tokunoshimensis*), dépourvues de chromosome Y, ce sont des copies additionnelles du gène *Cbx2* (Chromobox 2) (Kuroiwa *et al*, 2011) ou la duplication d'un enhancer de *Sox9* (Terao *et al*, 2022) qui semblent être impliquées dans la détermination testiculaire. Par ailleurs, chez les vertébrés non mammaliens, que leurs chromosomes sexuels suivent le système XY/XX ou ZZ/ZW, ce n'est pas *SRY* qui est responsable de l'initiation de la détermination testiculaire. Parmi les gènes impliqués, nous retrouvons *DMRT1* chez le poulet et ses orthologues tels que *DMY/DMRT1BY* (the DM-domain gene on the Y chromosome) chez le médaka (Matsuda *et al*, 2002; Nanda *et al*, 2002) ou encore *DM-W* (W-linked DMRT1 paralogue) chez le xénope (Yoshimoto *et al*, 2008) (voir le **paragraphe C** du **chapitre IV** pour plus de détails). D'autre part, chez le tilapia ou d'autres poissons, c'est l'AMH portée par le chromosome Y (*amhy*, Y-linked anti-Müllerian hormone) ou son récepteur (*Amhr2,* Anti-Müllerian hormone receptor type 2) qui correspondent au gène du déterminisme testiculaire (Hattori *et al*, 2012; Kamiya *et al*, 2012; Li *et al*, 2015).

Alors que le facteur déterminant du testicule varie en fonction des espèces de vertébrés, sa cible principale et exécuteur direct, *SOX9*/SOX9, est plutôt bien conservée. Dans les gonades XY ou ZZ, l'expression de SOX9 est cruciale pour induire la différenciation des cellules de Sertoli et orchestrer ainsi la différenciation testiculaire.

2. SOX9, le gène directeur de la différenciation testiculaire

SOX9 appartient à la famille des gènes SOX dont la caractéristique est d'être composés d'un domaine de fixation à l'ADN de type boite HMG, homologue à plus de 50% avec celui du gène *SRY*. Cette grande famille de gènes est divisée en 12 sous-groupes dont le E qui rassemble *SOX8*, *SOX9* et *SOX10* (Bowles *et al*, 2000).

a. Expression de SOX9

Chez la souris, l'expression de *Sox9* est détectée dès 10.5 j*pc* au niveau des crêtes génitales d'embryons XX et XY. Mais à partir de 11.5 j*pc*, elle devient très abondante de façon spécifique dans les crêtes génitales XY et se concentre au niveau du cœur de la gonade alors que les cellules de l'épithélium cœlomique ne l'expriment pas. De façon intéressante, avant 11.5 j*pc*, la protéine SOX9 est observée au niveau du cytoplasme des cellules de soutien et ce indépendamment du sexe de l'embryon. Après ce stade, sa localisation devient exclusivement nucléaire dans les cellules de soutien du testicule où il deviendra spécifique aux cellules de Sertoli dès 12.5-13.5 j*pc* avec un maintien de son expression tout au long de la vie (da Silva *et al*, 1996; Kent *et al*, 1996).

Cette spécification de l'expression de *Sox9* dans les gonades mâles à partir de 11.5 j*pc* est liée à SRY. Son suivi d'expression chez la souris a pu être réalisé en insérant un épitope tagué avec Myc juste avant le codon stop de *Sry*. Ainsi, à 11 j*pc*, quelques cellules exprimant SRY sont détectées juste en dessous de l'épithélium cœlomique au niveau de la région centrale de la gonade XY en développement. A ce stade, aucune cellule n'exprimant SOX9 n'est encore détectable. En revanche à 11.5 j*pc*, un plus grand nombre de cellules positives pour SRY est observé et la plupart d'entre elles expriment maintenant SOX9. Enfin, à 12 j*pc*, les cellules n'expriment plus beaucoup SRY mais sont positives pour SOX9 (Sekido *et al*, 2004). Ce profil d'expression progressive a été confirmé avec l'utilisation d'un anticorps spécifique à SRY (Wilhelm *et al*, 2005).

Un profil d'expression assez similaire a pu être décrit chez l'humain. SOX9 apparait au moment du pic d'expression de SRY puis sera maintenue dans les cellules de Sertoli. Une expression est également observée dans les ovaires mais à un moindre niveau que celui observé dans les testicules (Hanley *et al*, 2000; Mamsen *et al*, 2017).

b. Régulation de la localisation nucléaire de SOX9

Comme indiqué précédemment, SOX9 adopte une localisation nucléaire dès lors qu'il devient spécifiquement exprimé chez le mâle. Ce mécanisme de translocation nucléaire a pu être décrit en 2005. Le fait que dans les chondrocytes, la phosphorylation de SOX9 via la signalisation à l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) favorise son activité (Huang *et al*, 2000) a conduit les auteurs à étudier cela dans les gonades mâles en développement. Ils ont ainsi pu observer une augmentation significative de l'AMPc et de l'expression de PGD2 (Prostaglandine 2) dans les gonades mâles à 11.5 j*pc*. Ainsi à partir de ce stade, PGD2 active de façon spécifique son récepteur DP1 conduisant à la production de l'AMPc qui pourra être utilisé par la PKA (protéine kinase A) pour aller phosphoryler SOX9 et ainsi permettre sa translocation dans le noyau (Malki *et al*, 2005).

L'expression et surtout la localisation nucléaire de SOX9 seront maintenues dans les gonades XY tout au long de la vie. Diverses études ont montré que SOX9 avait un rôle déterminant et suffisant dans l'induction de la différenciation testiculaire.

c. Rôle nécessaire et suffisant de SOX9 dans la différenciation testiculaire

Suite à la découverte de *SRY*, l'intérêt s'est rapidement porté sur le gène *SOX9*. Chez l'humain, des mutations hétérozygotes dans *SOX9* conduisant à un syndrome de malformation squelettique, la dysplasie campomélique peuvent en effet être associées à une dysgénésie gonadique avec des phénotypes de Femmes XY dans 75% des cas (Foster *et al*, 1994; Wagner *et al*, 1994). L'étude de souris déficientes pour *Sox9* a par la suite permis de caractériser son rôle dans la différenciation testiculaire.

Le premier indice suggérant un rôle crucial de SOX9 a été obtenu par hasard, dans le cadre d'une étude visant à restaurer l'albinisme. Ainsi, une lignée de souris transgénique avec insertion d'un minigène a été générée conduisant à un phénotype associant une légère

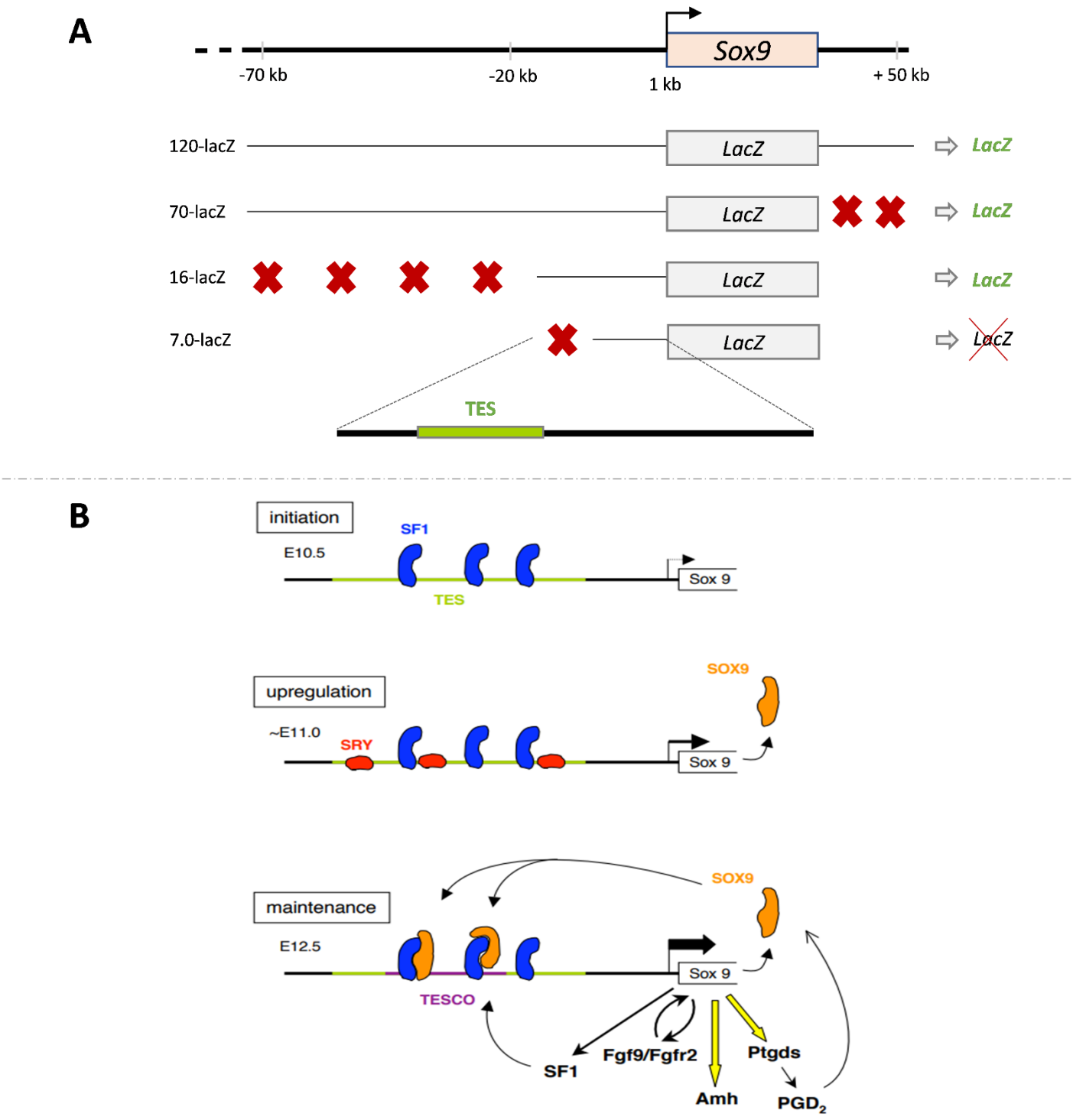
pigmentation à une microphtalmie chez le mâle fondateur. De façon étonnante, un excès de mâles a pu être observé dans sa descendance. La plupart d'entre eux ont le même phénotype que le fondateur et sont donc porteurs du transgène. Le génotypage de ces mâles transgéniques avec différents marqueurs du chromosome Y a mis en évidence que certains étaient XX. L'insertion du transgène a donc conduit à une inversion du sexe donnant le nom *Ods* (*Odsex*, dégénérescence oculaire avec inversion sexuelle) à cette mutation. Par des expériences de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization), les auteurs ont mis en évidence la présence d'un site d'intégration unique du transgène au niveau du chromosome 11, proche de *Sox9*. Cette localisation suggère donc que les souris transgéniques ont une régulation altérée de l'expression de *Sox9* conduisant à la formation de testicules chez les individus XX (Bishop *et al*, 2000).

La preuve de l'importance de SOX9 a ensuite pu être décrite en 2001. Grâce à la fusion avec le locus de *Wt1,* des travaux ont en effet induit une expression précoce de *Sox9*. L'analyse de ces souris transgéniques montre que tous les animaux XX sont phénotypiquement des mâles et développent des testicules qui expriment *Sox9* et l'*Amh*. Dès 13.5 j*pc*, les gonades transgéniques XX présentent une histologie similaire aux gonades XY contrôles (Vidal *et al*, 2001). Cette étude montre ainsi que SOX9 peut remplacer SRY et ainsi induire le développement testiculaire chez les individus XX.

Une autre preuve a été apportée en analysant le développement gonadique chez des animaux XY où son expression est supprimée. Mais le fait que des mutations hétérozygotes du gène *Sox9* provoquent des malformations osseuses et respiratoires conduisant à une létalité périnatale (Bi *et al*, 2001) rend l'étude de gonades post-natales complexe.

Une étude a, dans un premier temps, voulu supprimer SOX9 de façon spécifique à la gonade en utilisant une Cre-recombinase dépendante de SF1. Le moment où la Cre va s'allumer ainsi que son efficacité étant variables d'un embryon à l'autre, la formation de cordons testiculaires a été observée entre 13.5 et 18.5 j*pc*. Bien qu'ils soient en nombre réduit et avec un contour irrégulier, les souris XY ne présentent pas d'inversion sexuelle (Chaboissier *et al*, 2004). Les auteurs ont ensuite voulu supprimer de façon globale l'expression de *Sox9*. Cela entrainant la mort des embryons à 11.5 j*pc*, les gonades ont été prélevées à ce stade puis mises en culture pour être étudiées deux à trois jours après. Ainsi, les gonades XY ne forment pas de cordons testiculaires et expriment des gènes de la voie femelle (Chaboissier *et al*, 2004).

En utilisant une autre Cre-recombinase (dépendante de la cytokératine 19), une autre étude a finalement pu observer une inversion sexuelle chez les XY dès 12.5 j*pc*. En effet, dès



<u>Figure 12.</u> Mise en évidence de l'implication du TES/TESCO dans la régulation de l'expression de *Sox9* chez la souris.

(**A**) L'élément TES a été mis en évidence en étudiant la région comprenant les 70 kb en amont et les 50 kb en aval du premier intron de *Sox9*. Le gène rapporteur *LacZ* a permis le suivi de l'expression suite à la délétion de différents fragments du clone. Alors que la suppression des fragments de 70 ou 16 kb en amont de *Sox9* n'impacte pas l'expression du *LacZ*, la suppression de la zone entre -7 et -16 kb conduit à l'abolition de son expression. L'analyse approfondie de cette zone a ainsi mis en évidence la présence de l'élément TES, nécessaire à l'induction de l'expression de *Sox9*. (**B**) Avant que SRY ne soit à des niveaux suffisants, SF1 se fixe sur l'élément TES afin d'initier l'expression de *Sox9* dès 10.5 *jpc*. Par la suite, la fixation de SRY vers 11 *jpc* permettra une production plus importante de transcrits *Sox9*. SOX9 sera ainsi capable de s'auto-réguler en se fixant sur TESCO. Après l'arrêt d'expression de *Sry*, SOX9 et SF1 permettent le maintien de l'expression de *Sox9*.

Adapté de Sekido and Lovell-Badge, 2008.

ce stade, les embryons XY déficients pour *Sox9* présentent des gonades morphologiquement proches des ovaires contrôles. L'expression de SOX9 n'est jamais détectée dans ces gonades alors que *Wnt4* adopte un profil caractéristique des gonades femelles (Barrionuevo *et al*, 2006).

Plus récemment, l'analyse de souris hétérozygotes pour *Sox9* a mis en évidence le développement d'ovotestis chez ces souris illustrant que les deux copies du gène sont requises au développement testiculaire (Bagheri-Fam *et al*, 2020).

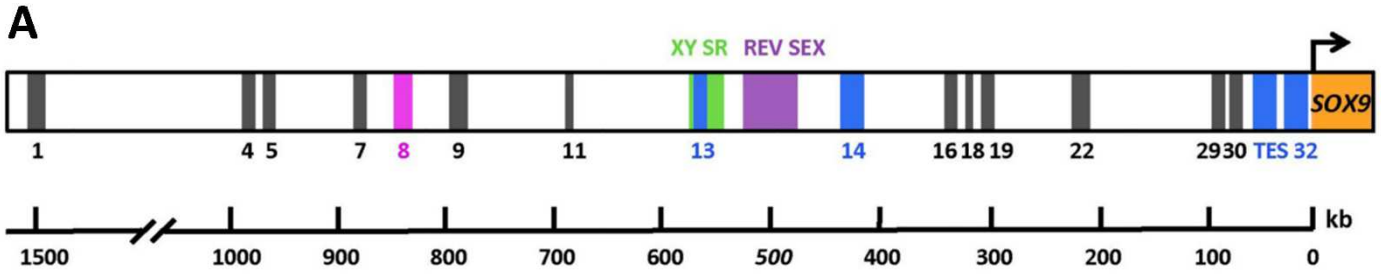
Ces études ont ainsi montré que l'expression du gène *Sox9* est cruciale et peut être suffisante pour induire la différenciation testiculaire. Il est donc nécessaire que son expression soit finement régulée.

d. Régulation transcriptionnelle de l'expression de SOX9

La présence d'éléments régulateurs de *SOX9* à une distance importante de son site d'initiation de la transcription a été suggérée dès l'identification des mutations chez l'humain. En 1994, Foster et collaborateurs avait en effet identifié que le point de cassure retrouvé chez les patients atteint de dysplasie campomélique et d'inversion sexuelle était localisé à 88 kb du début de *SOX9* (Foster *et al*, 1994).

Le premier élément impliqué dans la régulation de *Sox9* a ainsi pu être identifié chez la souris en étudiant la région allant de 70 kb en amont à 50 kb en aval du premier intron de *Sox9*. Grâce au couplage au gène rapporteur *LacZ*, les auteurs ont pu suivre l'impact de la délétion de différentes tailles de fragments. C'est ainsi qu'ils ont pu observer qu'une région de 3.2 kb située à 13 kb du site d'initiation de la transcription de *Sox9* est suffisante pour induire une expression correcte du rapporteur *LacZ*. Cette région a été nommée TES pour Testis-specific enhancer of *Sox9* **(Figure 12A)**. Au sein de ce TES, un fragment de 1.4 kb permet l'expression gonadique de *Sox9* et présente une forte homologie entre la souris, le rat, le chien et l'homme : c'est le TESCO (TES core element). Cette région présente en effet des sites de fixation pour SRY et SF1 dont la mutation combinée a pour conséquence une diminution drastique de l'expression de *Sox9* (Sekido & Lovell-Badge, 2008).

Les auteurs ont ainsi proposé que la régulation de l'expression de *Sox9* s'organise en trois phases chez la souris. La première correspond à la phase d'initiation avec la fixation de SF1 sur le TES dès 10.5 j*pc* et ce à la fois dans les gonades XY et XX. Ensuite, l'expression de SRY dans les gonades XY va permettre sa fixation sur le TES, conjointement à SF1, dès 11 j*pc* : c'est la phase d'augmentation de l'expression, spécifique aux gonades XY. Finalement,



<u>Figure 13.</u> Les différents enhancers présents dans les 1 500 kb en amont du gène *Sox9* chez la souris.

Position des 32 enhancers identifiés par Gonen *et al.*, 2018 ainsi que des régions XY SR, REX SEX et TES en amont de *Sox9*.

Issu de Gonen et al., 2018.

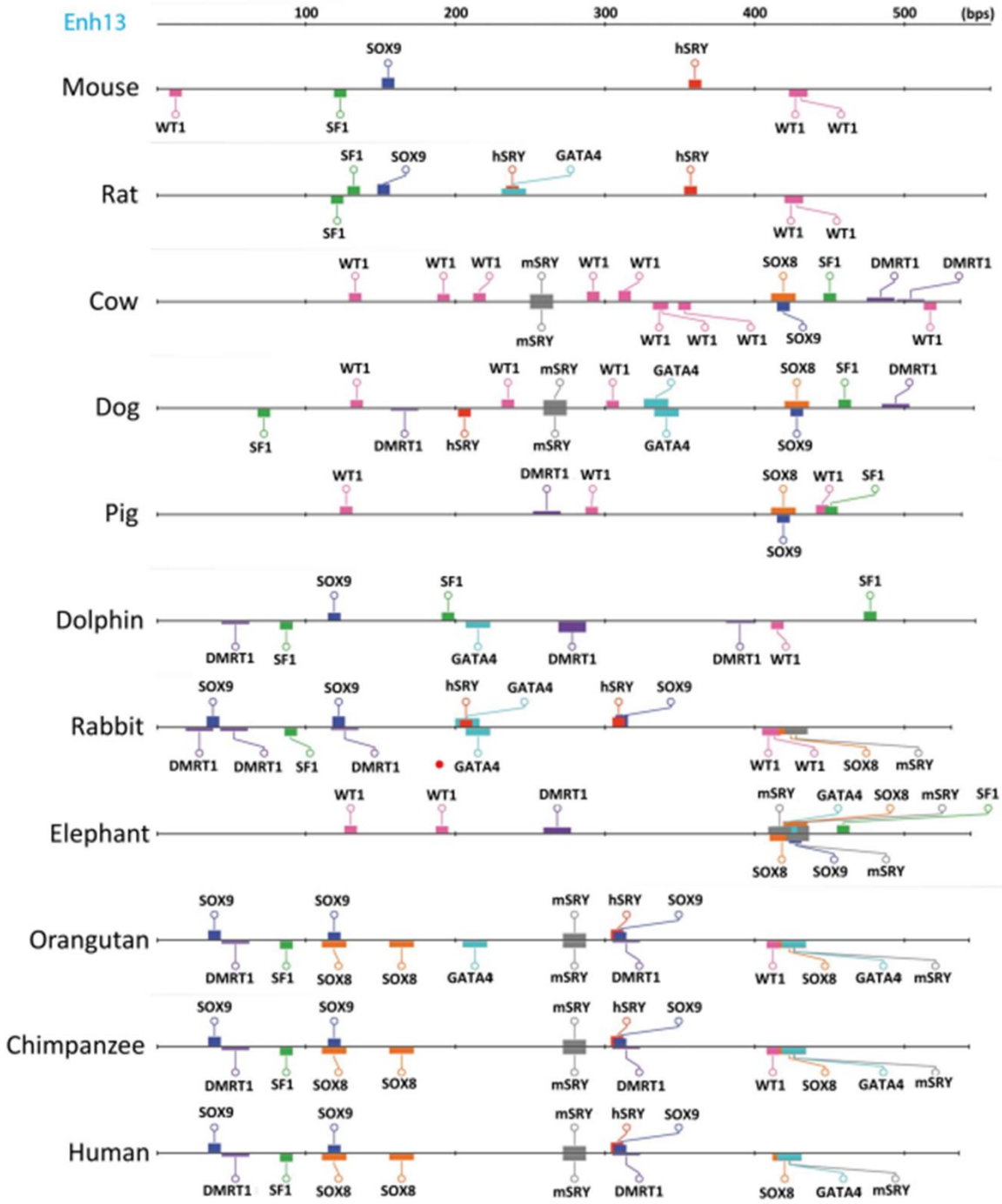
après l'extinction de *Sry*, SOX9 a atteint un niveau d'expression suffisant et peut aller se fixer lui-même sur le TESCO permettant ainsi son auto-régulation : c'est la phase de maintien **(Figure 12B)** (Sekido & Lovell-Badge, 2008).

D'autres gènes *Sox* composés d'une boite HMG semblent pouvoir se fixer sur TESCO et agir comme *Sry*. C'est le cas de *Sox3* (SRY-box transcription factor 3) qui peut promouvoir l'activation de *Sox9* mais ne permet pas son auto-amplification (Sutton *et al*, 2011). Par ailleurs, lorsque la boite HMG de *Sry* est remplacée par celle de *Sox9* ou de *Sox3*, les souris transgéniques XX développent des ovaires (Bergstrom *et al*, 2000). Les boites HMG de *Sox3* et *Sox9* peuvent donc fonctionnellement substituer celle de *Sry* illustrant une nouvelle fois l'importance de ce domaine de liaison à l'ADN au cours de la différenciation testiculaire.

L'importance de TES/TESCO dans la régulation de l'expression de *Sox9* a toutefois été remise en question suite à deux études publiées en 2017 et 2018 (Gonen *et al*, 2017, 2018).

La première étude a en effet montré que la délétion de l'élément TESCO n'impactait pas le développement testiculaire chez la souris. Ainsi, l'analyse histologique des gonades XY ou XX TESCO$^{-/-}$ ne montre aucun signe d'anomalies morphologiques, d'inversion du sexe ou encore de défauts de gamétogenèse quel que soit le stade étudié (12.5 j*pc*, 14.5 j*pc* et 6 semaines). L'étude de l'expression de *Sox9* montre quant à elle une expression à environ 72% des niveaux contrôles chez les XY TESCO$^{+/-}$ et à environ 62% chez les XY TESCO$^{-/-}$. La délétion de TESCO ne diminue pas suffisamment l'expression de *Sox9* et n'a, de ce fait, pas d'effet sur la différenciation testiculaire (Gonen *et al*, 2017). Cette étude met ainsi en avant que TESCO n'est pas l'élément régulateur principal impliqué dans l'initiation de l'expression de *Sox9*. Il est néanmoins nécessaire à atteindre un niveau optimal d'expression de *Sox9* mais agit avec d'autres éléments régulateurs pour induire la différenciation testiculaire.

En combinant diverses analyses au niveau d'une large région en amont de *Sox9*, la deuxième étude a permis l'identification de l'enhancer clé de sa régulation chez la souris : l'enhancer 13 (Enh13). Tout d'abord, à partir de données de DNaseI-seq obtenues sur des cellules de Sertoli triées à 13.5 et 15.5 j*pc* (Maatouk *et al*, 2017), 14 régions présentant une ouverture de la chromatine et pouvant potentiellement correspondre à des enhancers ont été sélectionnés pour des essais de validation *in vivo*. En parallèle, des expériences d'ATAC-seq sur des cellules triées de gonades XX et XY à 10.5 et 13.5 j*pc* ont permis d'ajouter deux régions candidates supplémentaires aux essais de validation *in vivo*. Seize lignées différentes de souris transgéniques ont ainsi été générées après clonage de chacun de ces enhancers putatifs devant le gène rapporteur *LacZ*. Seules 4 lignées (Enh8, Enh13, Enh14 et Enh32 ; **Figure 13**)



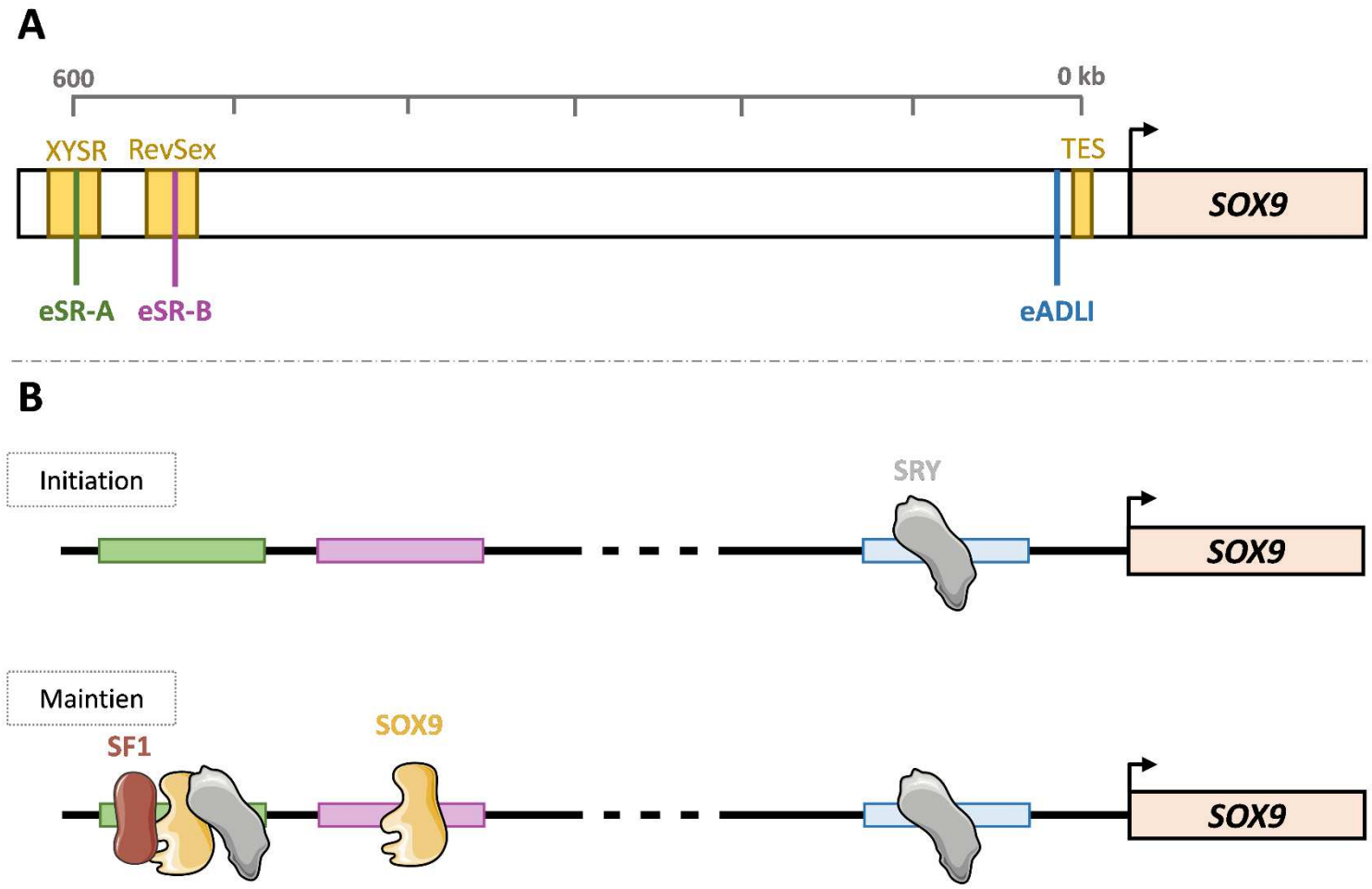
<u>Figure 14.</u> Comparaison des sites de fixation de facteurs clés au niveau de l'enhancer 13.
Les sites de fixation pour SRY, SOX9 et SF1 au sein de l'enhancer 13 sont largement conservés chez de nombreuses espèces. Non retrouvés chez les rongeurs, des sites pour DMRT1 sont présents chez toutes les autres espèces analysées.
Issu de Gonen et al., 2018.

présentaient une expression spécifique du gène *LacZ* dans la gonade et ont été étudiées plus en détails (Gonen *et al*, 2018).

Il s'est avéré que l'Enh8 induisait en fait une expression plus robuste dans l'ovaire. L'Enh14 induisait quant à lui une expression robuste dans le testicule et les données de DNase-I-seq, ATAC-seq et de ChIP-seq H3K27Ac suggéraient qu'il correspondait à une région active et ouverte spécifiquement dans les cellules de Sertoli. Néanmoins, la délétion de cet Enh14 n'a pas entrainé de modification de l'expression de *Sox9*. Enfin, l'expression du gène rapporteur induite par l'Enh32 était assez faible dans le testicule et proche de celle mesurée dans le mésonéphros. Parmi les 4 enhancers induisant une expression spécifique dans les gonades, il ne restait donc plus que l'Enh13, qui correspond à une région de 557 pb (paires de bases) localisée à plus de 500 kb en amont du début de *Sox9* (Gonen *et al*, 2018).

La génération de souris mutantes pour cet Enh13 a permis la mise en évidence du rôle majeur de ce dernier. Alors qu'un développement testiculaire normal est observé chez les souris XY Enh13$^{+/-}$, les XY Enh13$^{-/-}$ développent des ovaires de façon similaire aux XX contrôles. Cette inversion du sexe s'explique par la diminution drastique du niveau d'expression de *Sox9* qui ne correspond plus qu'à 21% des niveaux contrôles chez les XY Enh13$^{-/-}$, soit une expression similaire aux ovaires contrôles. De façon intéressante, la diminution de l'expression de *Sox9* est associée à un maintien de l'expression de *Sry* (Gonen *et al*, 2018). Ces données illustrent donc que, contrairement à la délétion de TESCO, la délétion de l'enhancer 13 a un effet majeur sur la différenciation testiculaire. Chez la souris, il correspond donc à l'élément régulateur principal responsable de l'initiation de l'expression de *Sox9*, cruciale au développement des cellules de Sertoli. De plus, le maintien de *Sry* retrouvé dès que l'expression de *Sox9* est perturbée (Chaboissier *et al*, 2004; Gonen *et al*, 2017, 2018) suggère que SOX9 est capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'expression de *Sry*.

Cette étude démontre par ailleurs que l'Enh13 est fortement conservé entre les mammifères **(Figure 14)**. L'analyse de la séquence révèle la présence de site consensus pour plusieurs facteurs de transcription : SF1, WT1, SRY et SOX9. Ces sites sont en effet tous conservés des rongeurs aux primates mais aussi chez le dauphin, l'éléphant ou encore le lapin. Ainsi, de la même façon que pour TES, SF1 et SRY peuvent se lier à l'Enh13 pour initier l'expression de SOX9. Une fois un niveau de transcription suffisant, SOX9 pourra ensuite lui-même se lier à cet enhancer et auto-réguler son expression. De façon intéressante, des sites de fixation pour DMRT1 sont aussi présents chez tous les mammifères étudiés, sauf chez les rongeurs (Gonen *et al*, 2018). Chez ces espèces, DMRT1 n'apparait pas jouer de rôle crucial au



<u>Figure 15.</u> Régulation de l'expression de *SOX9* chez l'humain.
(**A**) Trois éléments régulateurs principaux ont été décrits chez l'humain (Croft *et al.*, 2018). L'enhancer eSR-A se retrouve dans la région XYSR dont la délétion est associée à des phénotypes de 46, XY DSD (Kim *et al.*, 2015). L'enhancer eSR-B est dans la région RevSex qui, lorsqu'elle est dupliquée, conduit à la formation d'ovotestis chez les individus XX (Benko *et al.*, 2011). L'enhancer eALDI est lui à proximité du TES. (**B**) Alors que seul eALDI permet l'initiation de l'expression de *SOX9* suite à la fixation de SRY, les trois enhancers coopèrent pour son maintien. SF1, SOX9 et SRY ont tous les trois des sites de fixation sur eSR-A alors que seul SOX9 semble se fixer sur eSR-B.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

moment de la différenciation testiculaire (ceci sera détaillé dans le **Chapitre IV** de ce manuscrit).

Chez l'homme, il a été suggéré que la régulation de l'expression de *SOX9* pourrait se faire de façon un peu différente et ferait appel à trois enhancers : eSR-A (Sex-Reversal Enhancer A), eSR-B (Sex-Reversal Enhancer B) et eALDI (enhancer Alternative Long-Distance Initiator) (Croft *et al*, 2018).

Le premier, eSR-A, a pu être identifié en analysant une région de 32.5 kb nommée XYSR (XY Sex Reversal region) **(Figure 15A)** dont la délétion avait été identifiée chez quatre individus présentant des désordres du développement sexuel (Kim *et al*, 2015). Des duplications de cette région ont également été retrouvées chez deux patients atteints de 46, XX DSD testiculaire ou ovo-testiculaire (Croft *et al*, 2018). L'analyse approfondie de cette région localisée en amont du gène *SOX9* a mis en évidence la présence d'un fragment d'environ 1 500 pb contenant un site de fixation pour SRY/SOX9 et deux pour SF1. Des mutations dans le site SRY/SOX9 et dans l'un des sites SF1 conduisent à une forte diminution de l'activité de l'enhancer. Le fragment critique contenant ces sites de fixation a ainsi été nommé eSR-A. Il présente une homologie de 80% avec l'Enh13 de souris et correspond donc à la région équivalente chez l'humain (Croft *et al*, 2018).

Le second a aussi pu être identifié en analysant une autre région régulatrice de *SOX9* de 24 kb, la région RevSex **(Figure 15A)**. La fragmentation en séquence d'environ 2 kb a montré que deux d'entre elles ont une activité augmentée en présence de SF1 et de SOX9. Les 400 pb communes à ces deux fragments contiennent en effet un motif de fixation pour SOX9 hautement conservé. Cet enhancer eSR-B présente par ailleurs 75% d'homologie avec la souris mais la délétion de sa région orthologue n'entraine pas d'inversion sexuelle dans le modèle murin. eSR-B semble donc être spécifique à l'humain (Croft *et al*, 2018).

Enfin, le troisième, eALDI correspond à 1200 pb localisées à proximité de TESCO **(Figure 15A)** renfermant un site de fixation pour SRY/SOX9 et SF1. Cette région présente une conservation de séquence de 78% chez la souris. Sa délétion entraine une diminution de l'expression de *Sox9* sans altérer l'expression de *l'Amh* ni de *Wnt4*. Bien que la région orthologue à eALDI semble également jouer un rôle dans la régulation de l'expression de *Sox9*, sa délétion n'entraine pas de phénotype d'inversion sexuelle chez la souris (Croft *et al*, 2018).

Selon les auteurs de cet article, chez l'humain, l'initiation de l'activation de *SOX9* par SRY serait ainsi contrôlée par l'enhancer eALDI tandis que son auto-régulation positive nécessiterait une action combinée des trois enhancers (Croft *et al*, 2018) **(Figure 15B)**.

e. Signature génomique et cibles de SOX9

De récents travaux analysant les cibles de SOX9 à la fois dans le testicule fœtal de souris et de bovin (ChIP-seq SOX9) ont permis l'identification d'une signature génomique spécifique aux cellules de Sertoli. Cette étude a ainsi pu montrer que ces deux espèces partageaient un grand nombre de pics (sites) en communs, illustrant la capacité de SOX9 à réguler un même ensemble de gènes entre deux espèces assez éloignées d'un point de vue évolutif. L'analyse des données enrichies de façon similaire a par ailleurs mis en évidence la présence de motifs de fixation pour SOX9, DMRT1 et GATA4. L'étude de l'enrichissement de ces trois facteurs de transcription chez d'autres mammifères a quant à elle confirmé la conservation de cette signature génomique. Les régions régulatrices des gènes liées par SOX9 présentent donc un enrichissement spécifique pour les sites de fixation de SOX9, GATA4 et DMRT1 (Rahmoun *et al*, 2017).

Ensuite, en comparant les cibles de SOX9 aux gènes dont l'expression est dérégulée dans des gonades déficientes pour *Sox9*, les auteurs ont pu montrer qu'il était à la fois capable de fixer des gènes exprimés par les cellules de Sertoli mais aussi des gènes impliqués dans la voie femelle. Nous retrouvons notamment le gène codant pour l'AMH, dont la régulation par SOX9 avait déjà été démontrée (De Santa Barbara *et al*, 1998), *Dhh, Fgf9, Ptgds* et *Cyp26b1*. Du côté des gènes de la voie femelle, *Foxl2*, *Rspo1*, *Wnt4* et *Fst* font partie des cibles de SOX9 (Rahmoun *et al*, 2017). De la même façon que SRY (Li *et al*, 2014), SOX9 agit en tant qu'activateur transcriptionnel pour des gènes clés de la différenciation testiculaire alors qu'il réprime les gènes impliqués dans la différenciation ovarienne. Le maintien de son expression tout au long de la vie permettra une inhibition permanente afin de protéger le testicule de la voie femelle.

En ciblant le gène codant pour l'AMH, SOX9 va contribuer au développement du tractus mâle puisque cette hormone est nécessaire à la régression des canaux de Müller chez les XY (Behringer *et al*, 1994). L'expression de l'AMH est ainsi détectée dans les cellules de Sertoli juste après le début de l'expression de SOX9. Cette expression est encore présente à la naissance puis disparait dans les testicules adultes (Munsterberg & Lovell-Badge, 1991). De précédents travaux avaient démontré une forte activation de l'AMH en présence de SOX9 et de SF1 (De Santa Barbara *et al*, 1998). SOX9 est en effet responsable de l'initiation de l'expression de *l'Amh* alors que SF1 est nécessaire à son augmentation (Arango *et al*, 1999).

En plus de son implication dans la formation de la lame basale (décrit en **partie A)2.** de ce chapitre), *DHH* est également impliqué dans la différenciation des cellules de Leydig. Il est exprimé par les cellules de Sertoli dès 11.5 j*pc* et agit via un de ses récepteurs PTCH1 (Patched 1) qui est exprimé dans les cellules de Leydig dès 12.5 j*pc* (Yao *et al*, 2002). Une fois différenciées, les cellules de Sertoli vont ainsi permettre la différenciation des autres types cellules composant les gonades mâles.

3. Différenciation des cellules de Leydig et mise en place de la stéroïdogenèse

Comme indiqué dans la **partie A)1.** de ce chapitre, les cellules de Leydig dérivent des cellules de l'épithélium cœlomique et du mésonéphros (DeFalco *et al*, 2011; Kumar & DeFalco, 2018; Ademi *et al*, 2022). Ces dernières ont pour principale fonction la production d'androgènes nécessaires à la persistance et la différenciation des canaux de Wolff chez les individus XY ainsi qu'à la virilisation du tractus reproducteur mâle (Yeh *et al*, 2002). C'est pourquoi la perturbation de la mise en place du lignage des cellules de Leydig se retrouve souvent associée à des phénotypes de 46, XY DSD (Griswold & Behringer, 2009).

L'implication des cellules de Leydig dans la stéroïdogenèse permet leur identification grâce à certaines enzymes impliquées dans ce processus. En période fœtale, P450scc (CYP11A1, Cytochrome P450 family 11 subfamilly A member A1) est exprimée dès 12.5 j*pc*. P450C17 (CYP17A1, Cytochrome P450 family 17 subfamilly A member A1) et 3β-HSD (3-β-HydroxySteroid Dehydrogenase) sont quant à elles détectées à partir de 13.5 j*pc* (Greco & Payne, 1994; Baker *et al*, 1999).

L'implication de DHH dans la différenciation des cellules de Leydig a notamment pu être déterminée en étudiant l'expression de ces enzymes au sein de gonades XY n'exprimant plus le gène *(Dhh$^{-/-}$)*. Chez les souris contrôles, l'expression de P450scc (CYP11A1) apparait dans une petite portion des cellules exprimant PTCH1 à 12.5 j*pc*. La proportion de cellules coexprimant P450scc et PTCH1 augmente à partir de 13.5 j*pc* alors qu'à ce stade, P450scc est totalement absent dans la majorité des gonades XY *Dhh$^{-/-}$* (Yao *et al*, 2002).

En induisant de façon ectopique la signalisation Hedgehog dans les cellules somatiques d'un ovaire fœtal de souris, d'autres travaux ont confirmé l'importance de DHH dans la différenciation des cellules de Leydig. Ainsi, des cellules exprimant CYP17A1 sont présentes au sein des gonades des souris XX transgéniques. Ces souris présentent un pseudo-hermaphrodisme avec la différenciation des canaux de Wolff associée à la persistance des dérivés des canaux de Müller. La présence de cellules exprimant INSL3 (Insulin-Like Factor

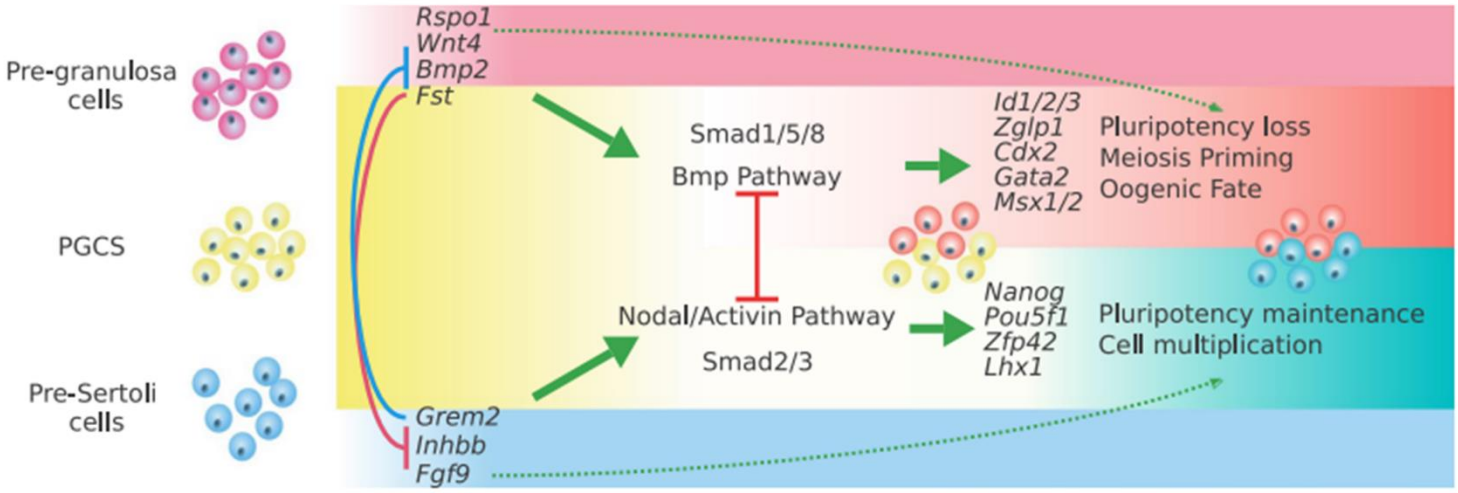
3) chez les souris XX transgéniques confirme également l'induction de la différenciation des cellules de Leydig (Barsoum *et al*, 2009). INSL3 est en effet une hormone peptidique spécifiquement produite par ces cellules de Leydig et impliquée dans la descente des testicules de l'abdomen au scrotum. L'absence de cette hormone chez les souris XY conduit à une cryptorchidie (Nef & Parada, 1999).

DHH est donc l'un des facteurs impliqués dans la mise en place du lignage des cellules de Leydig. Une fois fonctionnelles, ces cellules pourront produire des androgènes impliqués dans la virilisation du tractus reproducteur. Elles produiront également une hormone nécessaire à la descente des testicules en position scrotale où une température plus faible est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse.

C) Engagement des cellules germinales vers leur voie de différenciation

Parallèlement à la différenciation des cellules somatiques au cours du développement gonadique, les cellules germinales doivent s'engager vers l'une des deux voies de différenciation (spermatogenèse ou ovogenèse) après avoir colonisé les crêtes génitales. La fenêtre temporelle de cet engagement a été déterminée chez la souris par Adams et collaborateurs en 2002. Lorsque des CGP isolées à partir de gonades XY à 11.5 j*pc* sont placées en culture avec des crêtes génitales XX, elles s'engagent vers l'ovogenèse. En revanche, isolées à 12.5 j*pc*, ces CGP se développent comme des spermatogonies illustrant que l'engagement des CGP XY vers la spermatogenèse a lieu entre 11.5 et 12.5 j*pc*. Passé cette période, même si elles sont placées dans un environnement XX, elles s'orientent vers la voie mâle. De la même façon, des CGP XX à 11.5 ou 12.5 j*pc* placées avec des crêtes génitales XY s'engagent vers la spermatogenèse. Ce n'est qu'à partir de 13.5 j*pc* qu'elles se développent comme des ovocytes même si elles sont placées avec des crêtes génitales XY. Les CGP XX perdent donc leur capacité à répondre aux signaux masculinisant entre 12.5 et 13.5 j*pc* et s'engagent vers l'ovogenèse (Adams & McLaren, 2002). Par ailleurs, il a aussi été démontré qu'à 11.5 j*pc*, les cellules germinales expriment principalement des gènes mâles (Jameson *et al*, 2012). Ce sont les signaux provenant des cellules somatiques femelles qui permettront l'engagement vers l'ovogenèse.

Cette implication cruciale des cellules de soutien a par ailleurs été confirmée lors d'analyses d'expériences de scRNA-seq réalisées entre 9 et 16.5 j*pc* chez la souris. Tandis que, les transcriptomes des cellules germinales XX et XY se superposent pendant les stades précoces



<u>Figure 16.</u> Contribution des cellules somatiques dans la différenciation sexuelle des cellules germinales chez la souris.

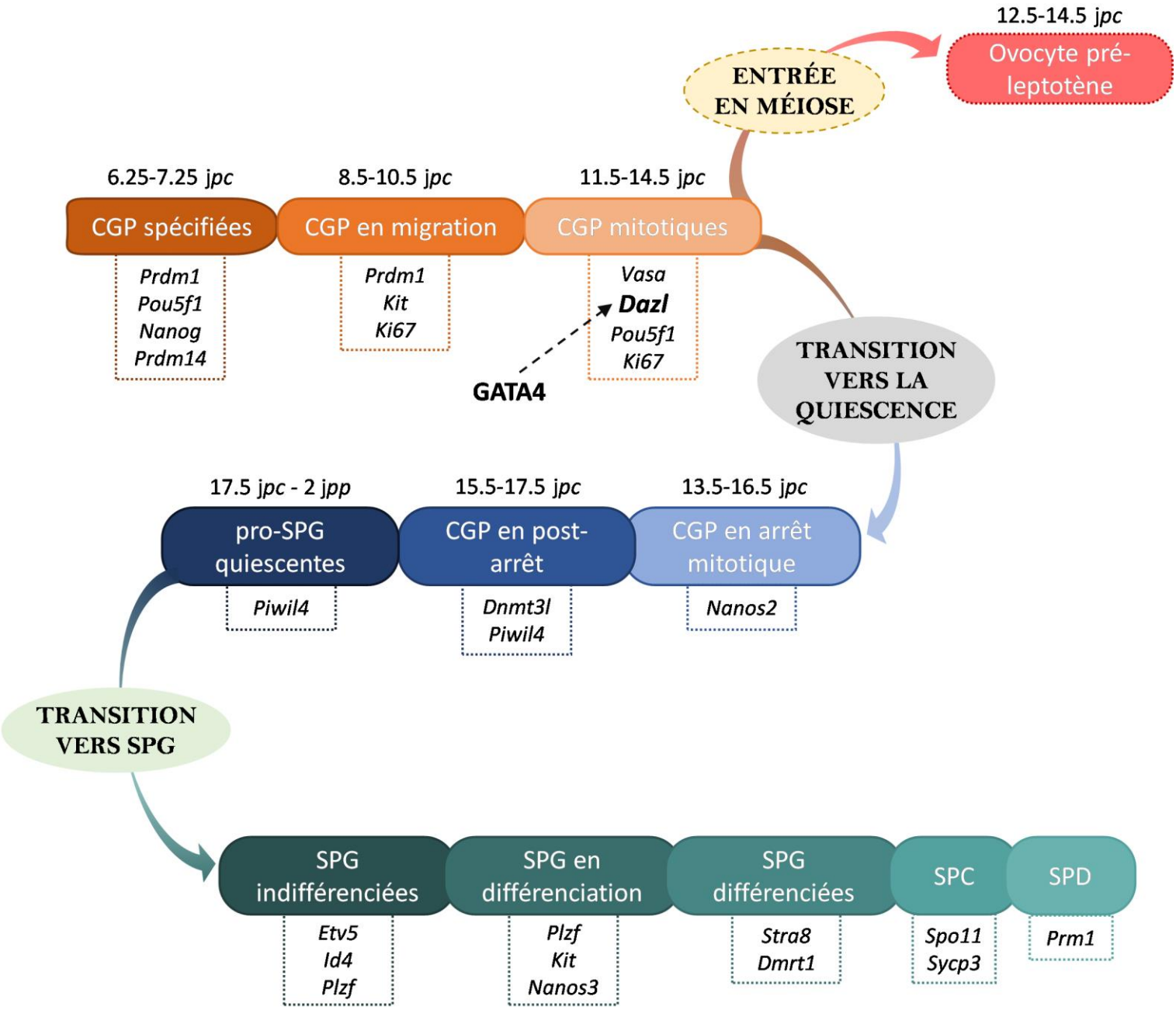
Dans l'ovaire, *Rspo1*, *Wnt4*, *Bmp2* et *Fst* synthétisés par les cellules de granulosa orientent les CGP (ou PGC, Primordial Germ Cells) vers un destin femelle afin qu'elles perdent leur pluripotence et qu'elles initient la méiose. Dans le testicule, *Grem2*, *Inhbb* et *Fgf9* produits par les cellules de Sertoli permettent quant à eux l'engagement des CGP dans la voie de différenciation mâle. Les CGP pourront ainsi maintenir leur pluripotence et proliférer.

Issu de Mayère et al., 2021.

du développement gonadique, ils commencent à adopter une voie spécifique au sexe dès 11.5 j*pc*. Parmi les gènes présentant une expression différentielle à ce stade, certains d'entre eux sont des cibles des voies de signalisation BMP et Nodal/Activine **(Figure 16)**. *Bmp2* et *Fst,* qui est un potentiel inhibiteur de la voie Activine, sont par exemple exprimés de façon spécifique dans les cellules de pré-granulosa dès 11.5 et 12.5 j*pc* respectivement. De façon opposée, *Inhbb* (Inhibin subunit Beta B) et *Grem2* (Gremlin 2), un inhibiteur de la voie BMP, sont quant à eux exprimés spécifiquement dans les cellules de Sertoli dès 12.5 j*pc*. Ces facteurs sécrétés de façon précoce par les cellules de soutien pourraient permettre de promouvoir une des deux voies de différenciation et ainsi prévenir son inhibition par les facteurs de la voie opposée (Mayère *et al*, 2021).

Cet engagement dans une voie de différenciation spécifique du sexe gonadique est également associé au « licensing » des cellules germinales correspondant à la transition des CPG en cellules compétentes pour la gamétogenèse et de ce fait l'acquisition de nouvelles caractéristiques. Chez le mâle, elles correspondent à la sortie du cycle cellulaire, la reméthylation de l'ADN ainsi que l'inhibition de l'entrée en méiose. Le facteur clé de ce licensing est le gène *DAZL*. Sa délétion chez la souris conduit à l'absence d'expression de *Nanos2* (Nanos C2HC-type zinc finger 2) et de marquage de la 5mC (5'méthyl-cytosine) associés à l'expression du marqueur de sortie de phase G0, Ki67. En l'absence de DAZL, les cellules germinales ne s'engagent pas vers la voie de différenciation spécifique au sexe (Gill *et al*, 2011).

Chez la souris, *Dazl* est exprimé dans la gonade en développement dès 11.5 j*pc*. Cette initiation est dépendante de l'expression de GATA4 et de son implication dans l'initiation de la formation de la crête génitale. En effet, lorsque ce processus est inhibé par la délétion du gène *Gata4*, les cellules germinales migrent vers le lieu de formation des crêtes génitales mais n'initient par l'expression de *Dazl*. La létalité embryonnaire dès 11.5 j*pc* causée par la délétion de GATA4 ne permettait pas l'étude du devenir des cellules germinales après ce stade. La mise en culture des complexes uro-génitaux collectées à 11.5 j*pc* a néanmoins permis d'observer qu'en absence de GATA4, les cellules germinales ont un programme d'expression similaire à celui des CGP. Elles maintiennent ainsi l'expression des gènes de pluripotence (*Nanog* (NANOG homeobox), *Oct4*, *Sox2* (SRY-box transcription factor 2) et *Ssea1*) et n'initient pas celle des marqueurs de cellules germinales sexuellement différenciées (*Dazl*, *Mvh* (Mouse Vasa Homolog), *Gcna* et *Mili* (Miwi-Like)). L'expression de GATA4 et la formation de la crête



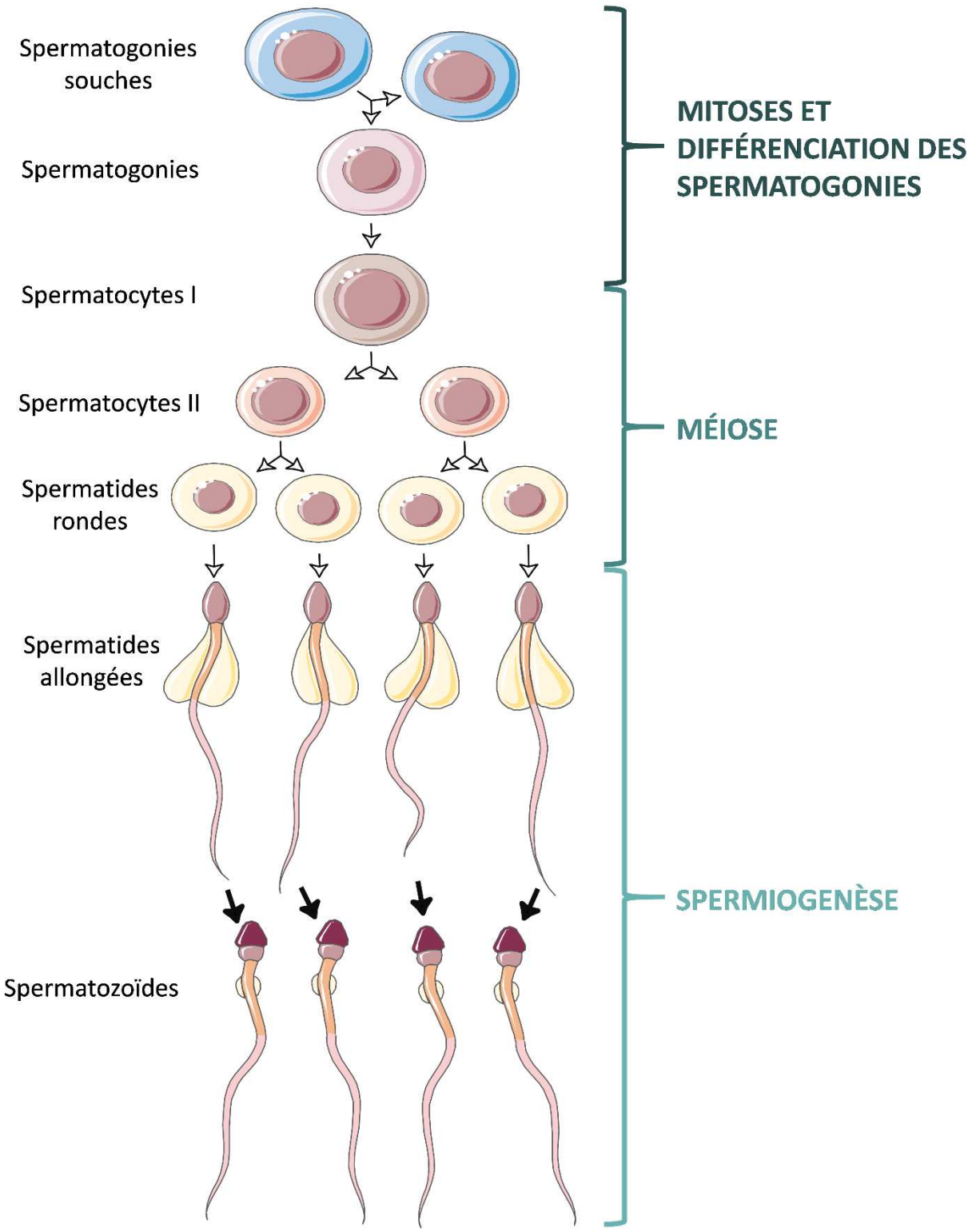
<u>Figure 17.</u> Licensing des cellules germinales et engagement dans la voie mâle chez la souris.
Après avoir migré puis colonisé les crêtes génitales, les CGP se multiplient par mitoses avant d'acquérir leur destin sexuel. GATA4 est exprimé par les cellules issues de l'épithélium cœlomique. Il permet la formation de la crête génitale qui produit des signaux nécessaires à l'expression de *Dazl,* le facteur clé du licensing. Ce gène va en effet rendre les CGP aptes à effectuer la gamétogenèse. Chez les femelles, cela va se traduire par une entrée rapide en méiose. Chez le mâle, en revanche, les CGP vont progressivement entrer en quiescence pour devenir des spermatogonies (SPG). Après la naissance, ces SPG vont se différencier, progresser en méiose et devenir des spermatocytes (SPC) puis des spermatides (SPD).
Adapté de Zhao et al., 2021.

génitale sont donc primordiaux pour le licensing des cellules germinales et ainsi leur différenciation (Hu *et al*, 2015).

Dans le testicule, l'expression précoce de *Nanos2* est le premier signe de l'engagement des cellules germinales vers la voie de différenciation mâle. Il est en effet exprimé de façon spécifique dans les cellules germinales mâles après leur colonisation des crêtes génitales. Les souris déficientes pour ce gène présentent bien un arrêt du cycle cellulaire à 14.5 j*pc* mais celui-ci n'est pas maintenu. Les cellules germinales reprennent donc leur prolifération à 15.5 j*pc* et expriment *Stra8* (Stimulated by Retinoic Acid 8), facteur clé du processus méiotique (Baltus *et al*, 2006). A ce stade, elles expriment aussi anormalement SYCP3 (Synaptonemal Complex Protein 3) signant qu'elles initient la méiose (Suzuki & Saga, 2008). En l'absence de *Nanos2*, les cellules germinales ne se différencient pas correctement vers la voie mâle et initient la méiose.

Conjointement à NANOS2, CYP26B1, exprimé dans les cellules de soutien, est impliqué dans l'inhibition de la méiose chez le mâle. Alors que chez les souris XY déficientes pour *Cyp26b1*, les cellules germinales entrent en méiose (MacLean *et al*, 2007), la délétion combinée de *Stra8* et *Cyp26b1* bloque leur entrée en méiose (Saba *et al*, 2014). La suppression de *Stra8* chez les XX permet l'expression de *Nanos2* et de *Dnmt3l* (DNA MethylTransferase 3 Like, qui code pour un cofacteur des DNMT3A et B), permettant la reméthylation de l'ADN des cellules germinales mâles (Saba *et al*, 2014). CYP26B1 permet donc d'initier la différenciation vers la voie mâle en empêchant l'expression de *Stra8*. Par la suite NANOS2, continuera de bloquer la méiose tout en permettant aux cellules germinales d'acquérir d'autres caractéristiques propres à la voie mâle.

Des expériences de scRNA-seq ont permis l'identification précise des différents stades de différenciation des cellules germinales et surtout la caractérisation de cellules « transitoires ». Rapidement après leur « licensing », les cellules germinales mâles vont entrer en arrêt mitotique et ne reprendront les divisions cellulaires qu'après la naissance. Ainsi, chez la souris, les premières CGP en arrêt mitotique sont détectées dès 13.5 j*pc* et il n'y a quasiment plus de CGP en mitose à 14.5 j*pc*. Cet arrêt mitotique se fait progressivement et l'analyse cellule par cellule permise par le scRNA-seq a permis l'identification de CGP transitoires partageant à la fois la signature transcriptomique des CGP mitotiques (expression de *Nanog*) et celle des CGP en arrêt mitotique (expression de *Nanos2*). Les CGP en arrêt mitotique vont progressivement devenir des pro-spermatogonies quiescentes qui entreront à nouveau dans le



<u>Figure 18.</u> Les trois grandes étapes de la spermatogenèse.
Après la phase de quiescence, les spermatogonies souches se divisent par mitoses afin de constituer la niche de cellules souches. Au cours de ces mitoses, une cellule fille va contribuer au renouvellement des cellules spermatogoniales souches alors que l'autre cellule fille va entrer en différenciation. Une fois entré en méiose, un spermatocyte primaire donnera deux spermatocytes secondaires puis quatre spermatides rondes. Celles-ci subiront finalement un ensemble de modifications morphologiques au cours de la spermiogenèse devenant ainsi des spermatides rondes puis des spermatozoïdes.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

cycle cellulaire entre 1 et 4 j*pp* (jours *post-partum*) pour donner des spermatogonies indifférenciées qui commenceront la méiose à la puberté (Zhao *et al*, 2021) **(Figure 17)**.

Le licensing des cellules germinales mâles signe donc leur passage de CGP à pro-spermatogonies. Chez la souris, à la naissance, ces pro-spermatogonies vont devenir des spermatogonies indifférenciées qui vont progressivement subir différentes étapes au cours de la spermatogenèse.

D) Mise en place de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus au cours duquel les spermatogonies vont subir d'importantes modifications cellulaires jusqu'à la formation des spermatozoïdes. Une première vague est rapidement initiée après la naissance de sorte à former le stock de spermatogonies (Yoshida *et al*, 2006). Ensuite, le processus complet, qui peut être divisé en trois grandes étapes **(Figure 18)**, débute vers 7 j*pp* chez la souris**.**

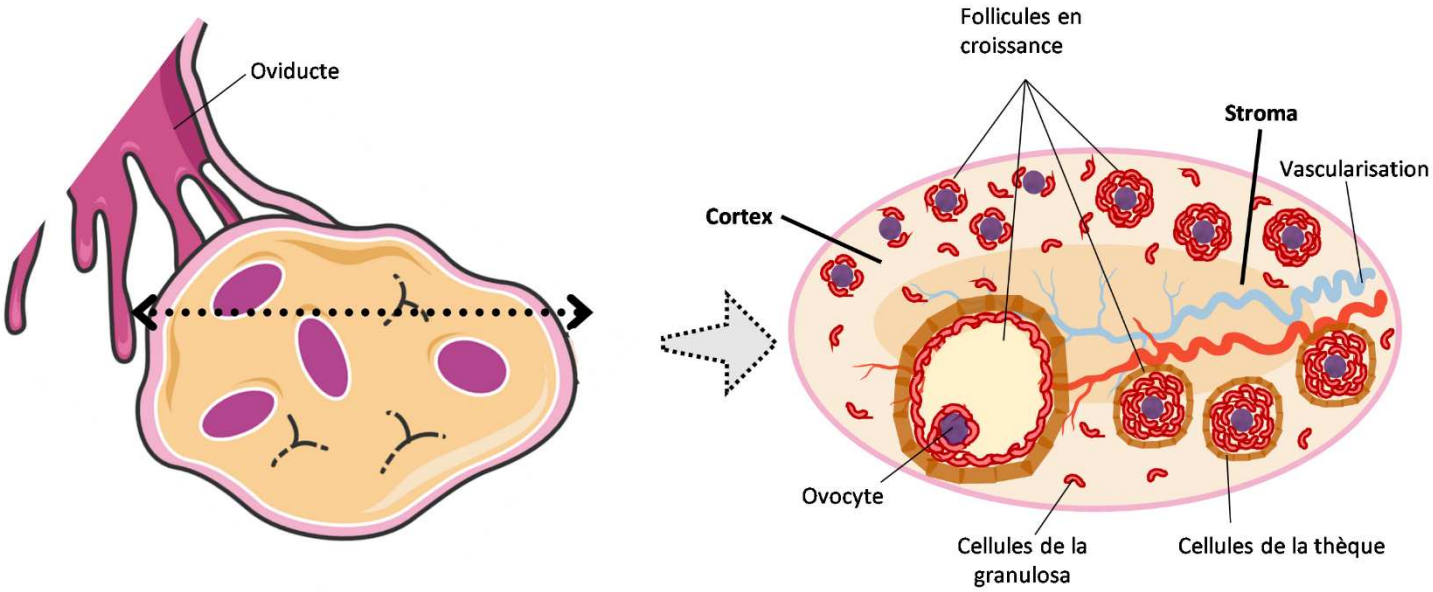
- Au cours de la première étape, les spermatogonies, qui auront migré au niveau de la lame basale des tubules séminifères au cours du développement testiculaire, seront mitotiquement actives. Ces divisions permettent à la fois le renouvellement des cellules souches spermatogoniales mais aussi l'entrée en différenciation des spermatogonies conduisant à la formation des spermatocytes.
- La deuxième phase correspond à la phase méiotique où les spermatocytes I, subiront deux divisons cellulaire successives donnant ainsi des spermatocytes II puis des spermatides rondes. Cette phase a lieu à la puberté soit quelques semaines après la naissance chez la souris ou plusieurs années chez l'Homme.
- Enfin, la troisième phase, permet la différenciation des spermatides rondes en spermatides allongées et enfin en spermatozoïdes. Au cours de cette étape appelée la spermiogenèse, les spermatocytes subissent de fortes modifications morphologiques afin d'aboutir à des spermatozoïdes qui seront libérés dans la lumière des tubules séminifères.

Tout au long de ce processus, les cellules germinales sont en contact étroit avec les cellules de Sertoli. Au fur et à mesure du développement testiculaire ces cellules forment la barrière hémato-testiculaire qui permet la création d'un microenvironnement spécifique avant le début de la méiose. Cette barrière permet ainsi la séparation des tubules séminifères en un

compartiment basal, contenant les spermatogonies, et un compartiment apical. Juste après leur entrée en méiose, les spermatocytes I passent dans le compartiment apical où elles subiront les divisions méiotiques et leur différenciation post-méiotique. Les cellules germinales localisées dans le compartiment apical sont ainsi isolées du système circulatoire et immunitaire. Cela créé un environnement privilégié pour le bon déroulement de la méiose (Mruk & Cheng, 2015).

Bien qu'avant la spermatogenèse, les cellules germinales suivent des trajectoires de différenciation similaires entre la souris et l'humain (Zhao *et al*, 2021), des différences spécifiques à l'espèce apparaissent ensuite. La principale spécificité correspond à la durée et au nombre de stade observés au cours de la spermatogenèse. Tandis que chez la souris, 12 stades sont observés sur une durée de 35 jours (Oakberg, 1956), chez l'homme la spermatogenèse dure 74 jours avec seulement 6 stades (Clermont, 1963).

En conclusion, la formation d'un testicule capable de produire des gamètes fonctionnels repose donc principalement sur les cellules de Sertoli. Ces dernières sont non seulement essentielles à la différenciation des types cellulaires du testicule mais aussi à la création d'un environnement optimal nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse.



<u>Figure 19.</u> Morphologie d'un ovaire adulte.
Le cortex ovarien, correspondant à la zone la plus extérieure de l'ovaire, renferme les follicules ovariens aux différents stades de leur croissance au cours de la folliculogenèse. La zone la plus interne correspond au stroma ovarien fortement vascularisé.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

CHAPITRE III

La différenciation ovarienne

Dès la vie fœtale, l'ovaire s'organise en deux compartiments : le cortex ovarien où sont regroupées les cellules germinales au sein de cordons ovigères et la médulla incluant les cellules stromales ou cellules de la thèque. Cette organisation sera maintenue tout au long de la vie. A l'âge adulte, un ovaire fonctionnel présente ainsi **(Figure 19)** :

- Au niveau cortical, des follicules ovariens constitués d'un ovocyte entouré d'une ou plusieurs assises de cellules de la granulosa et d'une lame basale.
- Une riche vascularisation dans la médulla, au cœur de l'ovaire, au sein du stroma ovarien.

De la même façon que pour le testicule, les mécanismes cellulaires permettant la différenciation morphologique d'un ovaire sont contrôlés par un ensemble de facteurs génétiques conduisant à la formation d'un ovaire capable de produire des gamètes et des hormones sexuelles.

A) Les grands aspects morphogénétiques de la différenciation ovarienne

Alors que dans les gonades mâles, la différenciation des cellules de Sertoli constitue l'élément crucial du développement testiculaire, dans les gonades femelles, c'est l'entrée en méiose qui est l'évènement majeur. Les processus de différenciation puis de développement ovarien sont conditionnés à cette entrée en méiose.

1. Morphogenèse précoce de l'ovaire

La phase de morphogenèse précoce de l'ovaire présente des différences notables entre les espèces de mammifères. Elle correspond aux processus morphogénétiques typiques qui se mettent en place avant le moment où les cellules germinales entrent en méiose. Ainsi, chez la souris, les cellules germinales initient rapidement la méiose, avant même que l'ovaire soit organisé en parties corticale et médullaire (espèce à méiose immédiate). En revanche, chez les autres espèces telles que l'humain, le lapin ou les ruminants, l'organisation ovarienne se met en place bien avant l'entrée en méiose (espèces à méiose décalée). Dès l'initiation de la formation de la gonade, les cellules somatiques et les cellules germinales vont proliférer entrainant un

épaississement de la partie corticale. Lors de leur prolifération, les cellules germinales restent connectées entre elles permettant la formation de cordons ovigères dans le cortex ovarien. C'est au sein de ces cordons que les cellules germinales vont s'engager vers la voie de différenciation femelle.

De façon intéressante, une synthèse d'œstrogènes peut être observée dans l'ovaire précoce, avant l'entrée en méiose des cellules germinales, chez les espèces à « méiose décalée » telles que le lapin (George *et al*, 1978), l'humain (George & Wilson, 1978) ou la chèvre (Pannetier *et al*, 2006). Chez la souris, en revanche, les œstrogènes et les autres hormones stéroïdes ne sont produites que lors de l'initiation de la folliculogenèse (Greco & Payne, 1994).

Le rôle des œstrogènes dans la différenciation ovarienne précoce a pu être étudié suite à la délétion du gène *CYP19A1* (Cytochrome P450 family 19 subfamily A member A1) qui code pour l'Aromatase, enzyme responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes. Dans l'ovaire fœtal de lapin, l'absence d'œstrogènes est associée à une moindre prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique et des cellules germinales. Ces dernières sont ainsi moins nombreuses lors de la formation des cordons ovigères et le cortex ovarien a, de ce fait, une épaisseur diminuée. L'absence d'estrogènes a également un effet sur la formation des follicules liés à une diminution combinée des cellules de la granulosa et des cellules germinales (Jolivet *et al*, 2022). Chez le lapin, bien que leur absence ne perturbe pas l'organisation de l'ovaire, les œstrogènes sont importants dans la prolifération cellulaire essentielle par la suite à la formation des follicules.

2. Contrôle de l'entrée en méiose des cellules germinales femelles

Rapidement après la colonisation des crêtes génitales XX, les cellules germinales vont entrer en mitose, subir des divisons successives et rester groupées au niveau du cortex ovarien. En effet, la majorité des cellules germinales sont observées par deux voire quatre à 10.5 j*pc* chez la souris. Ces groupes deviendront ensuite de plus en plus importants conduisant à l'observation de nombreux groupes avec huit à seize cellules reliées entre elles par des ponts intracellulaires à 13.5 j*pc* (Pepling & C. Spradling, 1998). L'expression de DAZL permettra ensuite leur « licensing » (Saunders *et al*, 2003; Gill *et al*, 2011) afin qu'elles s'engagent vers la voie de différenciation femelle et qu'elles entrent rapidement en méiose. Ce processus correspond à deux divisions successives composées de quatre phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Dans un premier temps, les ovocytes vont initier la

prophase I de méiose puis être bloqués dans cette phase (Borum, 1961; Speed, 1982). Ce n'est qu'au moment de l'ovulation que la méiose se poursuivra (Ayalon *et al*, 1972). L'ovocyte terminera ainsi la première division de méiose puis s'engagera dans la seconde avant d'être une nouvelle fois bloqué en métaphase II. Cette seconde division de méiose ne sera terminée qu'une fois que l'ovocyte sera fécondé par un spermatozoïde (Channing *et al*, 1978).

Le contrôle de l'entrée en méiose a majoritairement été étudié chez la souris. De récents travaux combinant des techniques d'ATAC-seq et de scRNA-seq ont montré que la transition mitose/méiose était graduelle avec notamment une accessibilité progressive au promoteur de *Stra8* (Zhang *et al*, 2023), gène crucial de l'initiation méiotique (Baltus *et al*, 2006). Grâce à leurs données, les auteurs ont également pu mettre en évidence l'implication d'un nouveau gène dans cette transition. Il apparait en effet que *Tcfl5* (Transcription Factor Like 5) présente une expression proche de celle de *Stra8* et qu'il régule l'expression de *Sycp3*, un marqueur de la formation du complexe synaptonémal (Zhang *et al*, 2023).

Pendant longtemps, il était admis que l'acide rétinoïque (RA, Retinoic Acid), notamment produit par le mésonéphros, jouait un rôle important dans l'initiation de la méiose des cellules germinales en activant l'expression de *Stra8* (Koubova *et al*, 2006). L'activation des éléments de réponses à RA a initialement été observée dans la région antérieure de l'ovaire (Bowles *et al*, 2006) où la méiose est initiée à 13.5 j*pc* chez la souris (Bullejos & Koopman, 2004). De plus, la culture de crêtes génitales femelles en présence d'antagonistes des récepteurs à RA conduisait à une diminution de l'expression de marqueurs méiotiques tels que *Stra8* (Bowles *et al*, 2006; Koubova *et al*, 2006), *Sycp3* et *Dmc1* (DNA Meiotic recombinase 1) (Bowles *et al*, 2006). A l'inverse, lorsque des testicules sont cultivés en présence d'un inhibiteur de CYP26B1, la dégradation de RA ne se fait plus entrainant l'augmentation de *Sycp3* et *Dmc1* à des niveaux similaires à ceux observés dans les ovaires contrôles. Ces observations ont conduit les auteurs à affirmer que l'acide rétinoïque était essentiel à l'entrée en méiose des cellules germinales femelles (Bowles *et al*, 2006).

Néanmoins, cela a été remis en cause par deux études publiées en 2020 étudiant le phénotype de souris déficientes pour les trois récepteurs de RA (Vernet *et al*, 2020) ou pour les trois enzymes permettant sa synthèse (Chassot *et al*, 2020).

Ainsi, l'absence de RARα (Retinoic Acid Receptor alpha), RARβ (Retinoic Acid Receptor bêta) et RARγ (Retinoic Acid Receptor gamma) n'impacte pas la méiose. Les auteurs

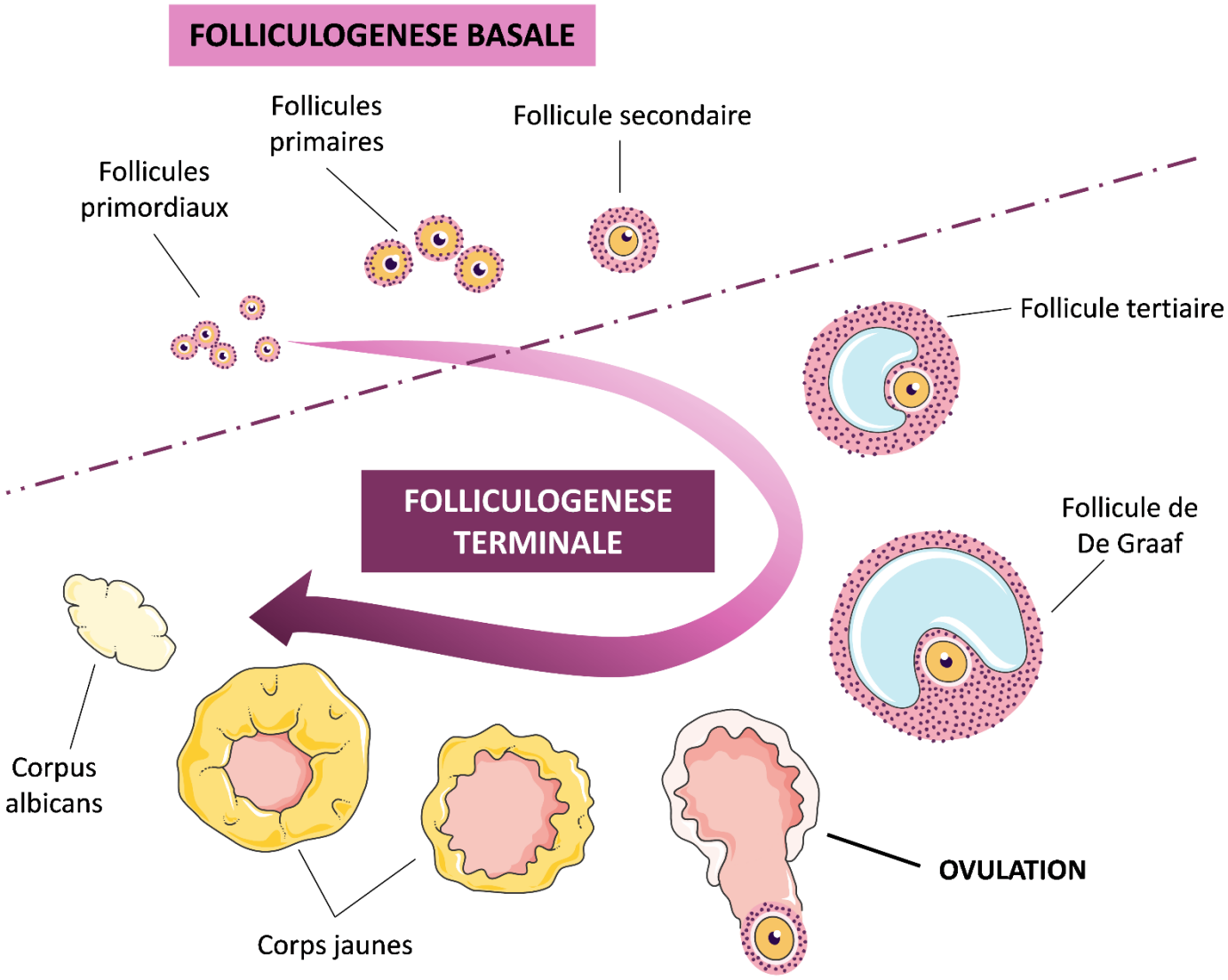
observent en effet de nombreuses cellules germinales exprimant SYCP3 et REC8 (REC8 meiotic recombination protein) à 14.5 j*pc* et ce, de façon similaire aux ovaires contrôles. L'analyse de l'expression de douze autres gènes spécifiques de la méiose montre également des profils similaires à ceux observés chez les souris contrôles. Bien que l'expression de *Stra8* soit retardée en l'absence des 3 RARs, la méiose s'initie dans les cellules germinales femelles. La létalité des fœtus à la naissance ne permettant pas l'analyse fonctionnelle de ces ovaires, les auteurs ont procédé à la collecte des gonades mutantes à 17.5 j*pc* puis à leur greffe sur des souris contrôles immunodéficientes (« nude »). Ces dernières ont pu donner naissance à des souriceaux confirmant que les ovaires mutants sont capables de produire des ovocytes fonctionnels (Vernet *et al*, 2020).

L'absence de phénotype méiotique est également observée lors de la suppression des trois enzymes permettant la synthèse de RA. Cette synthèse commence par l'oxydation de la vitamine A en rétinaldéhyde. Ensuite, les enzymes RALDH1 (Retinaldehyde Deshydrogenase 1) A1, A2 et A3 permettent la conversion en RA. La délétion des trois gènes codant pour ces enzymes conduit à une diminution de l'expression de *Stra8* à 13.5 j*pc*. Ce déficit est rapidement compensé et un marquage SYCP3 a permis de confirmer l'entrée en méiose des cellules germinales femelles (Chassot *et al*, 2020).

Alors que l'acide rétinoïque n'est pas essentiel à l'entrée en méiose chez la souris, la voie RSPO1/WNT4/β-caténine est quant à elle cruciale pour la différenciation des cellules germinales. Ceci sera détaillé en **partie B)1.c.** de ce chapitre.

3. Fragmentation des cordons ovigères et formation des follicules

Comme indiqué précédemment, les ovogonies rassemblées en cordons ovigères prolifèrent afin d'assurer une population suffisante d'ovocytes. Par la suite, la cassure programmée de ces cordons va permettre leur envahissement par les cellules de pré-granulosa qui les entouraient et conduit de ce fait à la formation des follicules primordiaux (Pepling & Spradling, 2001). Ces derniers sont générés uniquement au cours de cette étape permettant ainsi l'établissement de la réserve ovarienne. La formation de cette réserve est une étape clé pour la fertilité future des femmes/femelles puisqu'elle constitue le stock d'ovocytes disponibles pendant toute la vie reproductive. Un défaut dans l'établissement de cette réserve conduira à une stérilité précoce. Par la suite, ces follicules primordiaux seront sélectionnés et subiront une maturation folliculaire et ovocytaire jusqu'à l'obtention de follicules mûrs et d'ovocytes aptes à l'ovulation et la fécondation (Frost *et al*, 2022).



<u>Figure 20.</u> Le cycle ovarien.
Au cours de la folliculogenèse, les follicules vont passer par différents stades jusqu'à l'expulsion de l'ovocyte lors de l'ovulation. Initialement entourés de quelques cellules de la granulosa, les follicules primordiaux deviendront des follicules primaires lorsqu'une couche de ces cellules de la granulosa les entourent et qu'elles adoptent une forme cuboïde. La prolifération des cellules de la granulosa conduira à la création d'une seconde couche formant ainsi les follicules secondaires. C'est à ce stade que les cellules de la thèque sont recrutées à l'extérieur du follicule. Une cavité se formera ensuite pour donner les follicules tertiaires puis les follicules de De Graaf, prêts pour l'ovulation. Une fois l'ovocyte expulsé, les cellules folliculaires restantes donneront le corps jaune. Si l'ovocyte n'est pas fécondé, le corps jaune deviendra une cicatrice à la surface de l'ovaire appelée *corpus albicans*.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

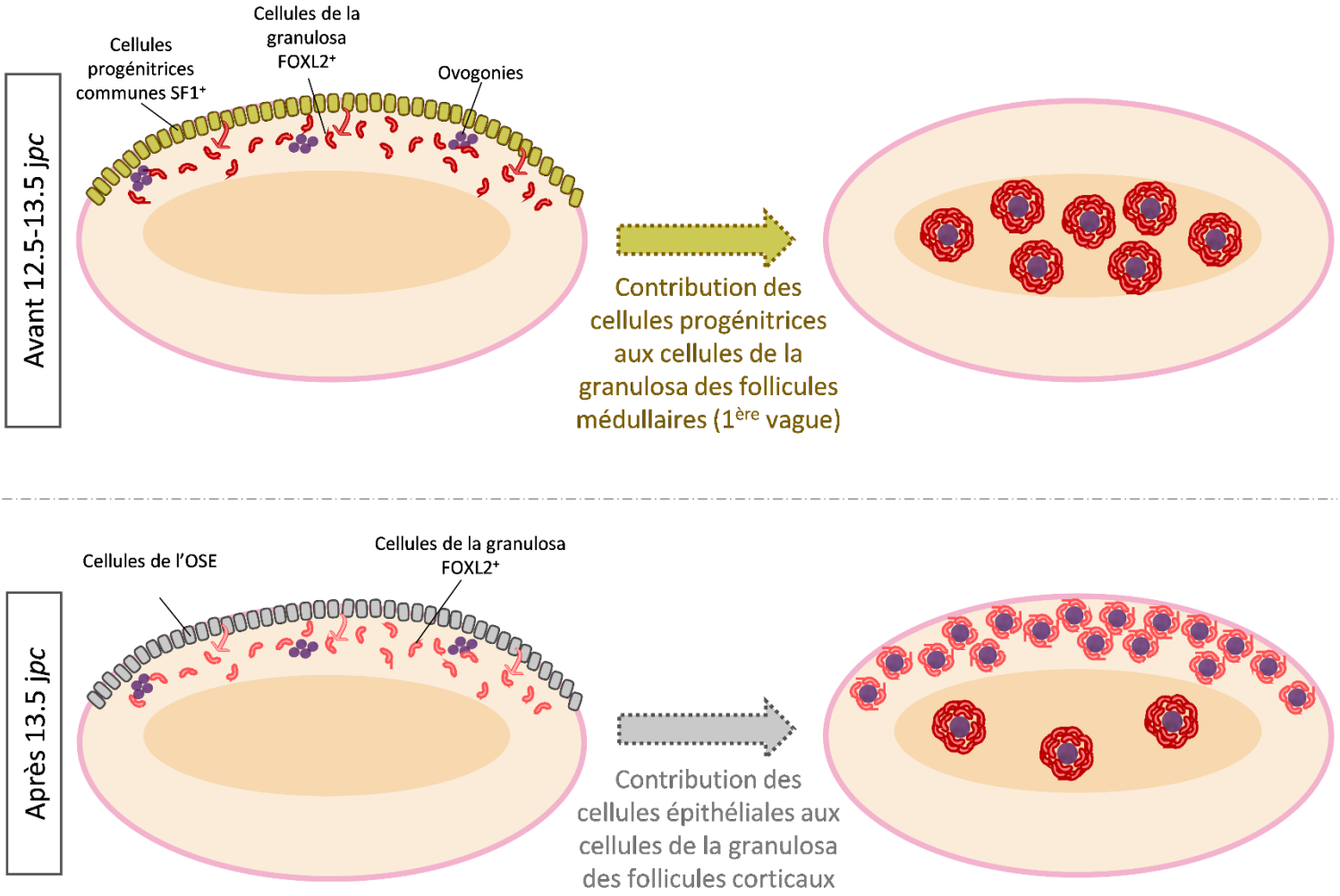
La fragmentation des cordons ovigères conduit donc à l'initiation de la folliculogenèse. Ainsi, un ovocyte entouré par quelques cellules de la granulosa aplaties correspond à un follicule primordial. Les ovocytes de ces follicules primordiaux vont sécréter différents facteurs permettant le changement morphologique des cellules de la granulosa. Elles vont en effet devenir cuboïdales et former une couche uniforme autour de l'ovocyte, conduisant ainsi à la formation de follicules primaires. Par la suite, la multiplication des cellules de la granulosa conduira à l'apparition de plusieurs couches de ces cellules formant les follicules secondaires (deux couches) puis tertiaires (trois couches). Jusqu'à ce stade, nous parlons de folliculogenèse basale, indépendante des hormones gonadotropes (FSH (Follicular Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone)). Les follicules deviennent ensuite progressivement sensibles à ces hormones synthétisées à partir de la puberté : c'est la folliculogenèse terminale (Edson *et al*, 2009). Après formation d'une cavité interne, appelée l'antrum, certains de ces follicules antraux vont continuer leur croissance et leur maturation à la puberté, sous l'influence de la FSH et de la LH sécrétées de façon cyclique (cycle œstral). Une certaine proportion de ces follicules matures va alors engager le processus d'ovulation (expulsion de l'ovocyte mature à l'extérieur de l'ovaire) sous l'action du pic de sécrétion de la LH hypophysaire (pic ovulatoire ou décharge de LH ovulante) **(Figure 20)**.

Les œstrogènes ont rôle clé dans ce processus de folliculogenèse puisque la formation des follicules est fortement perturbée chez les souris et les lapins déficients pour *Cyp19A1/CYP19A1* (Britt *et al*, 2000; Toda *et al*, 2001; Jolivet *et al*, 2022).

Les follicules constituent ainsi l'unité fonctionnelle du système reproducteur femelle puisque c'est au sein des follicules que l'ovocyte subira différentes étapes de maturation jusqu'à son expulsion lors de l'ovulation. Contrairement aux cordons séminifères chez le mâle, la formation des follicules et de la gonade femelle en général, dépend fortement de la présence des cellules germinales. En effet, lorsque des ovaires sont dépourvus de cellules germinales suite à l'expression de l'AMH par transgénèse chez les XX, les follicules ne se forment pas et des structures ressemblant à des cordons testiculaires stériles finissent par être observées dans ces gonades (Behringer *et al*, 1990).

Deux types cellulaires entourant les ovocytes et ont un rôle essentiel au cours de la folliculogenèse : les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque.

Les premières sont à l'ovaire ce que sont les cellules de Sertoli au testicule : des cellules de soutien des cellules de germinales. Les cellules de pré-granulosa entourent les cellules



<u>Figure 21.</u> Deux populations cellulaires à l'origine des cellules de la granulosa chez la souris.
Initialement, les cellules de la granulosa ont pour origine les cellules de l'épithélium cœlomique ou cellules progénitrices communes. L'expression de *Foxl2* permet ainsi l'engagement vers les cellules de soutien femelles. Ces cellules vont envahir les cordons ovigères pour entourer les ovocytes de façon individuelle. Cette première vague de follicules se retrouvera ensuite dans la partie médullaire de l'ovaire.
Par la suite, ce sont des cellules épithéliales de l'OSE (Ovarian Surface Epithelium) qui vont exprimer *Foxl2* et contribuer aux cellules de la granulosa qui seront retrouvées au niveau des follicules corticaux.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

germinales rassemblées en cordons ovigères. Les cellules de granulosa formeront ensuite des follicules au sein desquels elles vont contrôler la croissance et la maturation des ovocytes grâce aux facteurs qu'elles sécrètent lors du processus de folliculogenèse.

Comme indiqué dans la **partie D)2.** du **Chapitre I**, les cellules de Sertoli et les cellules de la granulosa ont pour origine commune les cellules progénitrices exprimant SF1 (Stévant *et al*, 2019). Ces cellules, qu'elles proviennent d'une crête génitale XX ou XY, sont transcriptionnellement proches et présentent un paysage chromatinien similaire. Il a même été montré que ces précurseurs des cellules de soutien présentent une prédisposition à la différenciation en cellules de pré-granulosa, qu'elles soient XX ou XY. C'est l'expression de *SRY* dans les précurseurs XY qui modifie leur destin et les orientent vers la différenciation des cellules de Sertoli chez les individus XY (Jameson *et al*, 2012; Garcia-Moreno *et al*, 2019).

Contrairement aux cellules de Sertoli qui forment une population unique, il a été décrit, chez la souris, qu'il existe deux sous-populations de pré-granulosa ayant chacune une origine propre **(Figure 21)**. Ceci a été démontré grâce au suivi du destin cellulaire des précurseurs issus de l'épithélium de surface de l'ovaire et l'analyse de l'expression d'un marqueur typique des cellules de la granulosa : FOXL2 (son rôle sera détaillé en **partie B)2.** de ce chapitre). L'équipe de Blanche Capel a ainsi montré que la population de cellules de pré-granulosa issue des précurseurs communs aux cellules de Sertoli (12.5-13.5 j*pc*) allait contribuer à la formation des follicules ovariens situés au centre de l'ovaire (Mork *et al*, 2012). Une deuxième population, elle aussi issue de l'épithélium de surface (OSE : Ovarian Surface Epithelium), apparait plus tardivement (13.5-14.5 jpc) et participe à la formation de follicules localisés au niveau du cortex ovarien (Mork *et al*, 2012; Rastetter *et al*, 2014). Cette double origine a été confirmée par des analyses de transcriptomique haut-débit en snRNA-seq. A 14.5 j*pc*, le cluster de cellules de pré-granulosa dérive clairement des cellules progénitrices communes et des cellules ayant une origine épithéliale (Niu & Spradling, 2020).

De façon intéressante, une autre population contribuant aussi aux cellules de la granulosa a pu être identifiée récemment. En effet, comme décrit dans la **partie A)4.** du **Chapitre II**, des données de sc-RNAseq ont permis l'identification des SLCs (cellules de « type soutien ») exprimant le marqueur PAX8. Ces cellules sont aussi présentes dans les gonades XX et sont principalement retrouvées à proximité du mésonéphros, dans la région où le *rete ovarii* se formera. Néanmoins, certaines d'entre elles sont observées dans l'ovaire et coexpriment *Foxl2*. Ces SLCs apparaissent donc comme contribuant également à la population des cellules de la granulosa (Mayère *et al*, 2022).

Les cellules de la thèque sont quant à elle recrutées autour des follicules à partir des stades secondaires et tertiaires (Lintern-moore & Moore, 1979). Alors que ces cellules semblaient dériver des cellules progénitrices semblables à des fibroblastes présents dans le stroma ovarien (Ungewitter & Yao, 2013), des données chez la souris montrent qu'elles sont issues des cellules progénitrices communes mais aussi des cellules dérivant du mésonéphros (Liu *et al*, 2015; Stévant *et al*, 2019). Le recrutement des cellules de la thèque est une étape primordiale puisqu'elles ont deux fonctions critiques : la production d'androgènes et l'établissement d'un système vasculaire essentiel à la croissance des follicules. Elles sont en effet capables de produire des androgènes en réponse à la LH (Baird *et al*, 1981) mais ne pourront pas les convertir. Cette conversion nécessite une enzyme exprimée par les cellules de la granulosa, l'aromatase (Hickey *et al*, 1988). Après la puberté, la formation de ces stéroïdes est donc uniquement possible dans les follicules déjà engagés en croissance puisqu'elle nécessite la coopération des cellules de la thèque avec les cellules de granulosa (Young & McNeilly, 2010).

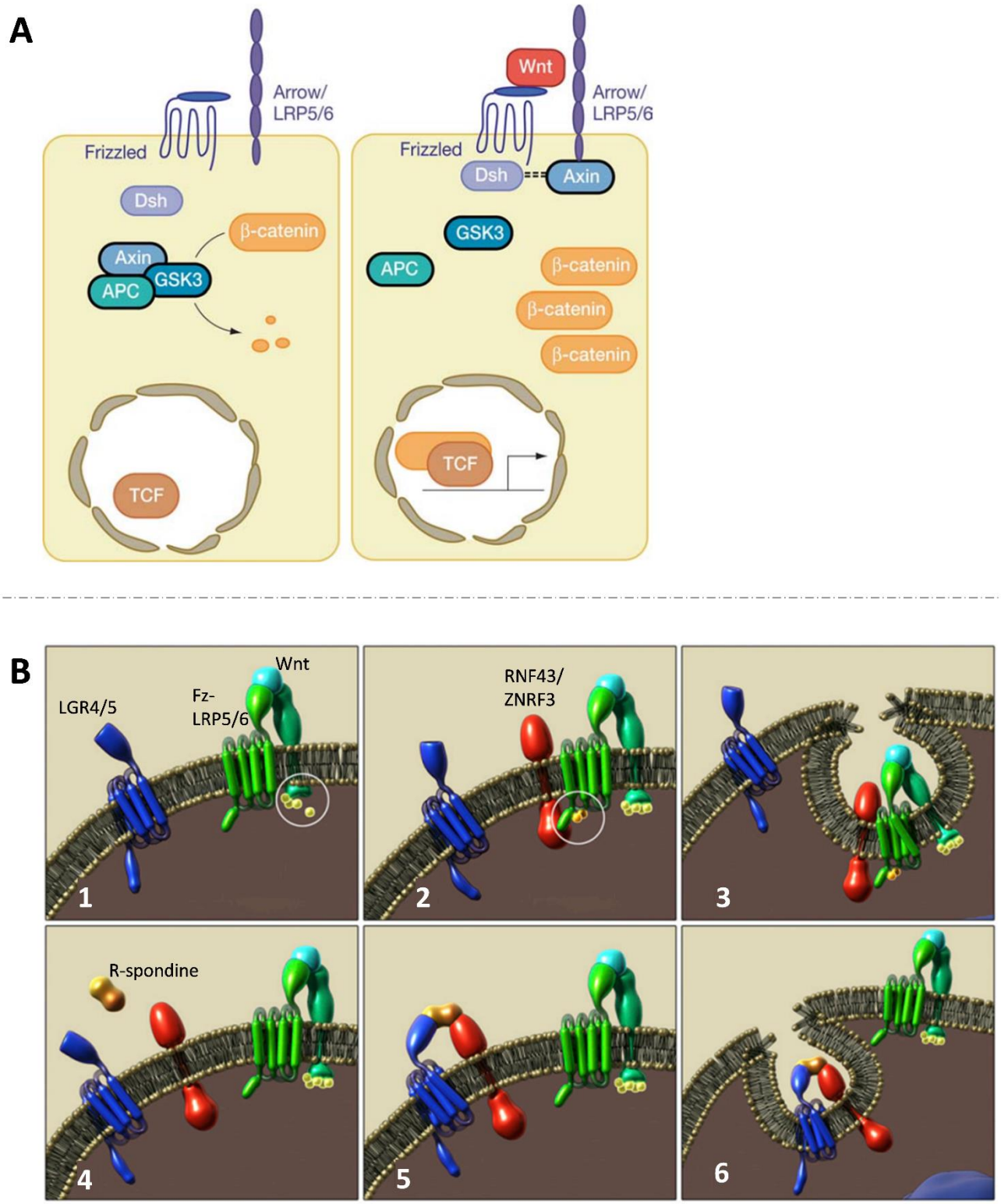
Ces grands aspects morphogénétiques de la différenciation ovarienne sont contrôlés par différents acteurs somatiques. Bien que la différenciation ovarienne ait longtemps été considérée comme « la voie par défaut », s'initiant en absence de chromosome Y et par conséquent du gène *SRY* chez les individus XX, il apparait maintenant que c'est un processus régulé de façon spécifique.

B) Contrôle génétique de la différenciation ovarienne

Seuls les principaux acteurs seront décrits dans cette partie : les molécules de signalisation RSPO1/WNT4 et leur implication dans la méiose ainsi que le facteur de transcription FOXL2 et son rôle dans la folliculogenèse.

1. La voie RSPO1/WNT4/β-caténine

RSPO1 est une protéine sécrétée appartenant à la famille des R-Spondines et capable d'activer directement la voie WNT/β-caténine (Kim *et al*, 2008) en se liant à deux récepteurs orphelins LGR4 (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled Receptor 4) et LGR5 (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled Receptor 5) (Carmon *et al*, 2011).



<u>Figure 22.</u> Activation de la voie WNT/β-caténine canonique.
(**A**) Lorsque les ligands WNT ne sont pas fixés à leur récepteur (LRP5/6 ou Fzd), un complexe de destruction se forme et phosphoryle la β-caténine. Elle sera ainsi ciblée par la protéasome pour être détruite et ne pourra pas activer ses gènes cibles (schéma de gauche). Lorsque les ligands WNT sont fixés à la membrane, leur récepteurs retiennent APC et GSK3β empêchant ainsi la formation du complexe de destruction. La β-caténine n'étant pas dégradée, peut aller dans le noyau et activer l'expression de ses gènes cibles. (**B**) En absence des ligands R-spondines, RNF43/ZNRF3 reconnait le complexe Fz-LRP5/6 entrainant l'internalisation de ce complexe (1-3). En présence de R-spondines, sa fixation sur le récepteur LGR4/5 va permettre le recrutement de RNF43/ZNRF3. Le complexe Fz-LRP5/6 reste ainsi à la membrane, permettant le maintien de la voie WNT (4-6).
*Issu de Logan & Nusse, 2004 (**A**) et de Lau et al., 2014 (**B**).*

WNT4 est aussi une protéine sécrétée appartement à la famille des WNT, qui agit en se liant au complexe Fzd/LRP (Frizzled/Low density lipoprotein Receptor-related Protein) (Bhanot *et al*, 1996; Tolwinski *et al*, 2003).

Des mutations dans ces deux gènes sont associées à des cas de DSD chez l'homme et seront décrites dans le paragraphe « d » de cette partie (Elejalde *et al*, 1984; Mohammed *et al*, 1989; Wieacker *et al*, 1996; Jordan *et al*, 2001; Parma *et al*, 2006; Mandel *et al*, 2008; Tomaselli *et al*, 2008).

a. Description de la voie WNT/β-caténine canonique

La voie de signalisation WNT est impliquée dans de nombreux processus morphogénétique tels que la prolifération et l'adhésion cellulaire (Logan & Nusse, 2004; Moon *et al*, 2004; Nusse, 2005). Dans l'ovaire, c'est principalement WNT4 qui exerce un rôle (Vainio *et al*, 1999).

La voie WNT canonique induit une cascade de mécanismes intracellulaires, permettant de contrôler *in fine* la localisation subcellulaire de la β-caténine et la régulation de l'expression de ses gènes cibles. En l'absence de ligands WNT, un complexe inhibiteur composé d'APC (Adenomatous Polyposis Coli), de GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3 beta) et de DVL (Dishevelled segment polarity protein) se forme, englobe la β-caténine cytosolique conduisant à sa phosphorylation, ubiquitination et destruction par le protéasome. Lorsque WNT4 se fixe sur ses récepteurs/co-récepteurs (Fzd/LRP5-6), le complexe APC/GSK3β/DVL est retenu au niveau membranaire permettant la stabilisation de la β-caténine cytosolique. Cette accumulation dans le cytosol permettra sa translocation dans le noyau **(Figure 22A)**. En interaction avec le facteur LEF/TCF (Lymphoid Enhancer Factor Family/T Cell Factor), la β-caténine pourra alors activer la transcription de ses gènes cibles comme le gène *Axin2* dont l'analyse de l'expression peut être utilisée pour suivre l'activation de la voie β-caténine. Certaines de ces cibles sont impliquées dans la différenciation ovarienne ou codent pour d'autres récepteurs impliqués dans cette voie de signalisation : c'est le cas de *Lgr5, Rnf43* (Ring Finger Protein 43) et *Znrf3* (Zinc And Ring Finger 3). Ces deux derniers ont même un effet de rétrocontrôle négatif puisqu'ils peuvent interagir avec le complexe Fzd/LRP5-6 conduisant à son endocytose et ainsi à l'arrêt de la signalisation WNT. En revanche, lorsque RSPO1 est présent, il se lie à ses récepteurs (LGR5 ou LGR4) qui seront alors capables d'interagir avec RNF43 et ZNRF3. Le complexe WNT/Fzd/LRP5-6 n'est donc pas internalisé, il reste à la membrane et la voie WNT/β-caténine est favorisée **(Figure 22B)** (Lau *et al*, 2014). Ainsi,

RSPO1 se positionne en amont et est donc un contrôleur de la voie WNT. Dans l'ovaire RSPO1 et WNT4 fonctionnent ainsi ensemble et présentent des profils d'expression similaires. C'est pourquoi les phénotypes associés à la perte de l'un ou l'autre de ces gènes partagent des similarités.

b. Expression de WNT4 et RSPO1 dans les gonades femelles

Chez la souris, *Wnt4* est exprimé dès 9.5 j*pc* dans le mésenchyme des gonades indifférenciées. Rapidement après la détermination sexuelle, son expression devient spécifique aux gonades femelles. *Wnt4* est par ailleurs fortement exprimé dans les cellules mésenchymateuses qui entourent les canaux de Müller (Vainio *et al*, 1999). Les données de scRNA-seq mettent en évidence une expression au niveau de cellules de pré-granulosa et des SLCs (Mayère *et al*, 2022).

RSPO1 est exprimé dans l'épithélium cœlomique des gonades XX et XY où il permet, avec WNT4, la prolifération des cellules de cet épithélium (Chassot *et al*, 2012). Il devient spécifique des cellules somatiques femelles à 12.5 j*pc* chez la souris (Parma *et al*, 2006).

L'activation de la voie β-caténine canonique peut être suivie *via* l'expression d'une de ses cibles « obligatoire », qui fait partie intégrante de la voie, le gène *Axin2*. Une étude chez des souris *Axin2-LacZ* (où le gène rapporteur *LacZ* est contrôlé par les éléments régulateurs du gène *Axin2* (knock-in)) montre ainsi que le marquage bleu, lié à l'expression de LacZ, est détecté au niveau de l'épithélium des gonades XY et XX (Chassot *et al*, 2012) alors qu'un fort signal n'est observé que dans les gonades XX dès 12.5 j*pc* (Chassot *et al*, 2008). Ce système permet de suivre uniquement les cellules cibles dans lesquelles la voie β-caténine est activée à savoir dans les cellules somatiques et les cellules germinales ovariennes.

c. Rôles de WNT4 et RSPO1 dans l'ovaire de souris

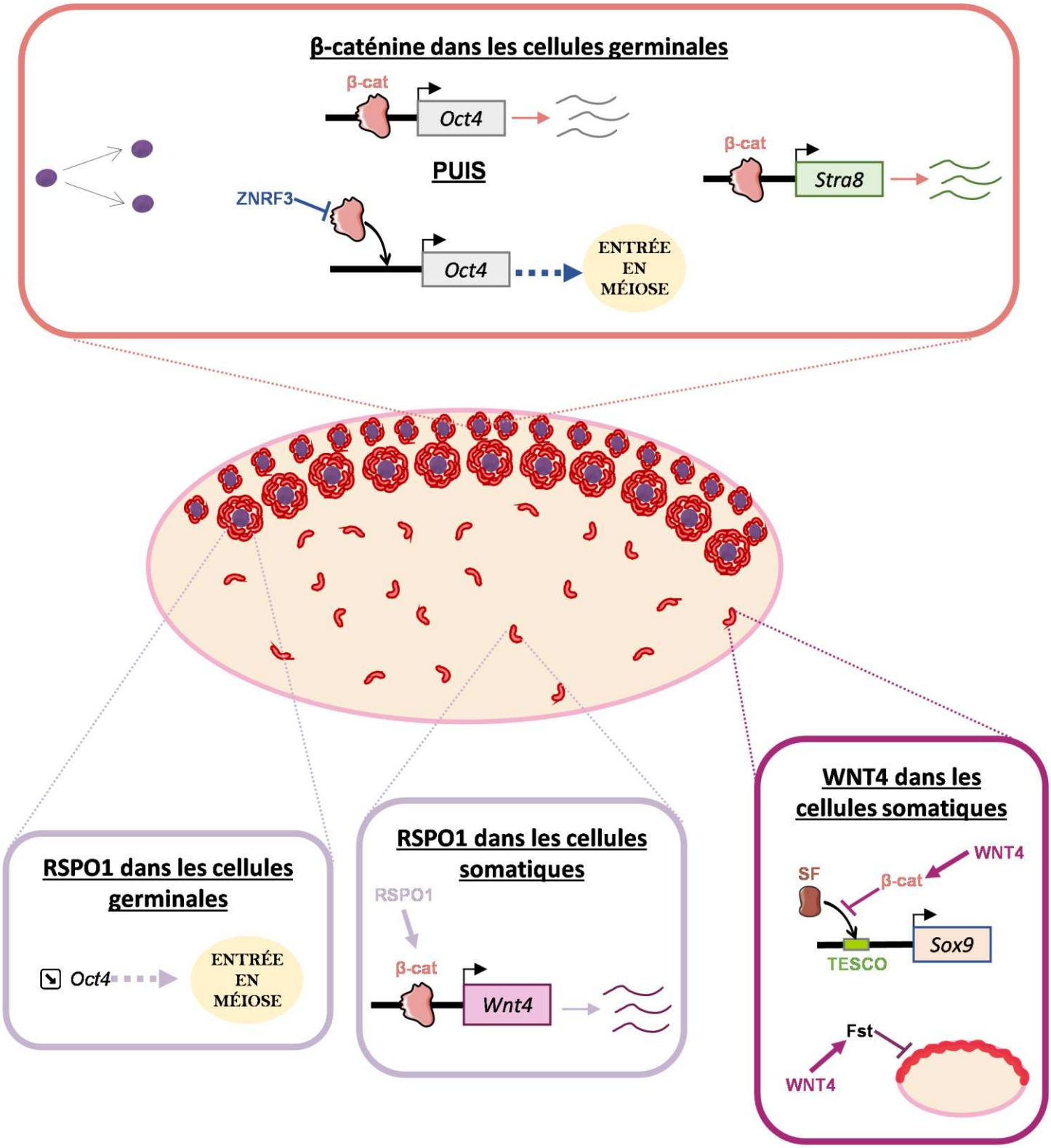
La génération de souris déficientes pour *Wnt4* (Vainio *et al*, 1999; Jeays-Ward *et al*, 2003; Heikkilä *et al*, 2005; Maatouk *et al*, 2013) ou *Rspo1* (Chassot *et al*, 2008, 2011) a permis la caractérisation de leur implication dans la différenciation/le développement ovarien. Le phénotype des souris *Rspo1*$^{-/-}$ et *Wnt4*$^{-/-}$ est assez similaire, mais différent sur quelques points et en particulier sur l'état des cellules germinales.

Les souris déficientes pour *Rspo1* ou *Wnt4* présentent en effet une masculinisation de leurs gonades XX et de leur tractus génital. La première caractéristique de la différenciation

mâle à être observée correspond à la formation du vaisseau cœlomique à la surface des gonades *Rspo1*$^{-/-}$ ou *Wnt4*$^{-/-}$ au même stade que chez les souris XY contrôles. L'autre caractéristique correspond à la différenciation de cellules de type cellules de Leydig avec l'expression d'enzymes de la stéroïdogenèse (*Cyp17a1*, *Cyp11a1* et *Hsd17b3)*. Les gonades des souris *Rspo1*$^{-/-}$ ou *Wnt4*$^{-/-}$ expriment aussi SOX9, l'AMH et DHH conduisant à la masculinisation des canaux chez ces animaux (Vainio *et al*, 1999; Jeays-Ward *et al*, 2003; Heikkilä *et al*, 2005; Chassot *et al*, 2008). Il est ensuite apparu que les cellules exprimant l'AMH dans les gonades *Rspo1*$^{-/-}$ ou *Wnt4*$^{-/-}$ étaient présentent bien avant l'expression de SOX9. Ceci démontre que les cellules de pré-granulosa déficientes pour *Wnt4* ou *Rspo1* se différencient précocement et se remettent à proliférer avant d'exprimer SOX9 (Maatouk *et al*, 2013). Ainsi, RSPO1 et WNT4 inhibent la différenciation testiculaire en empêchant notamment la formation du vaisseau cœlomique qui correspond au premier signe distinctif des gonades XY. Cette fonction passe par un rôle direct sur la follistatine, codée par le gène *Fst* qui, comme WNT4, est retrouvé au niveau des cellules de l'épithélium cœlomique. De la même façon que les souris *Rspo1*$^{-/-}$ ou *Wnt4*$^{-/-}$, la formation du vaisseau cœlomique est observée à la surface des gonades XX *Fst*$^{-/-}$. De plus, la follistatine n'est pas exprimée en absence de *Wnt4*$^{-/-}$. WNT4 active donc l'expression de la follistatine qui sera capable d'inhiber de la migration des cellules endothéliales et empêcher ainsi la formation du vaisseau cœlomique au sein des gonades XX (Yao *et al*, 2004).

Alors que les phénotypes pour les cellules somatiques sont similaires, la délétion de *Wnt4* ou *Rspo1* n'entraine pas le même phénotype sur les cellules germinales. Bien que chez les souris *Wnt4*$^{-/-}$ une perte des cellules germinales soient observée (Vainio *et al*, 1999; Maatouk *et al*, 2013), une partie des ovocytes restants sont capables d'initier la méiose (Naillat *et al*, 2010). La diminution du nombre de cellules germinales est aussi observée dans les gonades de souris XX *Rspo1*$^{-/-}$ mais cela est associé à une altération de l'entrée en méiose. Le marqueur de pluripotence *Oct4* est maintenu alors que l'expression de *Stra8* est diminuée. Une expression de *Nanos2* est même observée dans ces gonades illustrant l'orientation des cellules germinales vers la voie mâle (Chassot *et al*, 2011). RSPO1 a donc un rôle crucial dans le destin cellulaire des cellules germinales femelles et plus spécifiquement, dans leur capacité à initier la méiose.

Cette différence de phénotype peut s'expliquer par le fait que RSPO1 est requis pour l'action de WNT4 ainsi que pour son expression. L'expression de *Wnt4* est diminuée chez les XX *Rspo1*$^{-/-}$ alors que la suppression de *Wnt4* n'impacte pas l'expression de *Rspo1* (Chassot *et al*, 2008). Il peut ainsi initier la méiose des cellules germinales encore présentes dans les gonades XX *Wnt4*$^{-/-}$. De plus, l'expression de l'*Axin2* est diminuée chez les XX *Wnt4*$^{-/-}$ alors



<u>Figure 23.</u> Principales fonctions de la voie RSPO1/WNT4/β-caténine au cours de la différenciation ovarienne chez la souris.

Dans les cellules somatiques, en activant la β-caténine, RSPO1 permet l'expression de *Wnt4*. Également par l'intermédiaire de l'activation de la β-caténine, WNT4 inhibe la fixation de SF1 sur TESCO afin d'empêcher l'expression de *Sox9* et stimule l'expression de *Fst* afin d'inhiber la formation du vaisseau cœlomique à la surface de l'ovaire en développement. Finalement,.

Dans les cellules germinales, RSPO1 permet indirectement la diminution de l'expression de *Oct4* pour initier l'entrée en méiose. La β-caténine stimule la prolifération des cellules germinales et l'expression d'*Oct4*. Au moment de l'initiation en méiose, la β-caténine stimule l'expression de *Stra8* par les ovocytes alors que ZNRF3 vient inhiber l'activité de β-caténine afin de diminuer l'expression d'*Oct4*.

Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

qu'elle est totalement absente chez les XX *Rspo1*$^{-/-}$ (Chassot *et al*, 2008). RSPO1 est donc nécessaire à l'activation de la voie β-caténine dans l'ovaire.

L'implication de RSPO1 dans l'initiation de la méiose des cellules germinales XX a aussi été mise en évidence lors de l'analyse de souris déficientes pour le gène *Ctnnb1* (Catenin beta 1) codant pour la β-caténine. Ainsi, sa délétion de façon spécifique dans les cellules somatiques entraine une forte diminution de l'expression de *Stra8* et une absence de *Bmp2* conduisant à ce que les cellules germinales n'entrent pas en méiose. La délétion de *Ctnnb1* dans les cellules germinales conduit en revanche à une moindre prolifération de ces cellules associée à une diminution significative des niveaux d'*Oct4* et une expression de *Stra8* dès 12.5 j*pc*. Les cellules germinales se différencient donc de façon précoce. Les auteurs ont ensuite pu démontrer que la β-caténine interagit avec OCT4/POU5F1 permettant le maintien de la pluripotence dans les ovogonies. C'est l'expression progressive de *Znrf3* qui conduira à la régulation négative de l'activité de β-caténine, qui en cascade, permettra la sortie de l'état de pluripotence des ovogonies et leur différenciation en ovocytes suite à l'initiation méiotique (Le Rolle *et al*, 2021).

En plus de son importance capitale dans la différenciation des cellules somatiques ovariennes, la voie RSPO1/WNT4/β-caténine est ainsi tout aussi cruciale pour la différenciation des cellules germinales **(Figure 23).**

Par ailleurs, il a été décrit que WNT4 exerçait un rôle inhibiteur sur le développement mâle. Ce rôle a pu être étudié en cultivant des gonades de souris ou une lignée cellulaire de carcinomes embryonnaires testiculaires humains (NT2/D1). Ainsi, l'activation de la voie β-caténine est induite par la mise en culture en présence de LiCl (chlorure de lithium) qui inhibe GSK3β, favorisant ainsi la stabilisation de la β-caténine et sa translocation dans le noyau. Les gonades XY cultivées dans ces conditions présentent une diminution de l'expression de *SOX9*. Les auteurs montrent par la suite que cet effet sur *SOX9* passe par une diminution de l'activité de l'enhancer TESCO. L'activation de la voie WNT réduit l'occupation de SF1 sur cet élément TESCO au profit de la β-caténine. Cette voie bloque ainsi le développement mâle en inhibant la transcription de *SOX9* dans les gonades XX (Bernard *et al*, 2012).

d. Mutations de WNT4 et RSPO1 chez l'humain

Chez l'humain, plusieurs duplications du locus comprenant *WNT4* ont été décrites comme étant associées à des phénotypes de 46, XY DSD. Ces phénotypes vont de la cryptorchidie à la dysgénésie gonadique (Elejalde *et al*, 1984; Mohammed *et al*, 1989; Wieacker *et al*, 1996; Jordan *et al*, 2001). Le cas le plus sévère présente un tractus externe ambiguë, des organes génitaux mâles, un hypospadias et des gonades fibreuses contenant des tubules rudimentaires (Elejalde *et al*, 1984). Par ailleurs, une mutation homozygote impactant la stabilité de l'ARNm de *WNT4* a été décrite chez deux individus 46, XX. L'un présente un hypospadias et des ovotestis alors que l'autre a développé des testicules (Mandel *et al*, 2008).

Pour *RSPO1*, deux types de mutations ont été décrites chez l'humain. Des mutations homozygotes chez les individus XX ayant pour conséquence l'absence de protéine RSPO1 (mutations amorphes), conduisent au syndrome d'hyperkératose palmoplantaire associé à des dysgénésies gonadiques avec des phénotypes d'hommes XX (Micali *et al*, 2005; Parma *et al*, 2006). La substitution d'un nucléotide de l'intron 5 de *RSPO1* a aussi pu être mise en évidence chez une femme 46, XX avec un phénotype de DSD ovotesticulaire et d'hyperkératose palmoplantaire (Tomaselli *et al*, 2008).

La voie RSPO1/WNT4/β-caténine a donc une importance capitale dans le contrôle génétique de la différenciation ovarienne en jouant aussi bien sur le destin des cellules de soutien que sur celui des cellules germinales. Dans les cellules de la granulosa, sa coopération avec FOXL2 permettra le maintien de l'identité de ces cellules tout au long de la vie.

2. FOXL2, un acteur clé de la différenciation et/ou du maintien des cellules de la granulosa

Comme décrit précédemment, FOXL2 est un marqueur clé des cellules de pré-granulosa puis de la granulosa. Il appartient à la famille des facteurs de transcription FOX dotés d'un domaine de liaison à l'ADN « forkhead » et impliqués dans différentes fonctions au cours de l'embryogenèse et de la différenciation des tissus (Kaufmann & Knöchel, 1996; Lehmann *et al*, 2003). Chez l'humain, des mutations hétérozygotes affectant l'expression du gène *FOXL2* sont impliquées dans l'apparition d'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) dans le cadre d'un syndrome appelé BPES de type I (Blepharophimosis-Ptosis-Epicathus inversus Syndrome). Le phénotype principal de ce syndrome consiste en de multiples malformations des paupières (type

I et II), pouvant s'accompagner d'une IOP chez la femme (type I uniquement) (Crisponi *et al*, 2001; De Baere *et al*, 2001; Beysen *et al*, 2009). Chez l'humain, FOXL2 apparait donc comme étant essentiel à la fonction ovarienne.

a. Expression et localisation de FOXL2 dans l'ovaire

Chez la souris, FOXL2 présente une expression sexuellement dimorphique. Il est retrouvé dans les gonades XX en développement dès 12.5 j*pc* puis sera maintenu tout au long de la vie dans les cellules de la granulosa. Dans l'ovaire adulte, son expression diminue au fur et à mesure de la progression des follicules en folliculogenèse (Schmidt *et al*, 2004). Ce profil est également retrouvé chez la chèvre et l'humain avec une expression précoce et jamais retrouvée dans les cellules germinales (Cocquet *et al*, 2002).

Le gène *FOXL2* est par ailleurs bien conservé au cours de l'évolution. Le domaine de liaison à l'ADN et la région C-terminale sont similaires chez la souris, l'humain, la chèvre et le « poisson-ballon » (fugu) (Cocquet *et al*, 2002).

b. Rôles de FOXL2 dans l'ovaire de souris

Deux équipes se sont intéressées au devenir des gonades chez des souris déficientes pour *Foxl2* en utilisant des stratégies différentes pour supprimer *Foxl2*.

Ainsi, lorsque la totalité de la région codante est supprimée, les souris homozygotes ont un phénotype plus drastique que les patients atteints du syndrome BPES puisqu'elles présentent une hypoplasie des paupières. Alors que les ovaires mutants ne présentent pas de différences morphologiques avec les ovaires contrôles en période fœtale, dès une semaine après la naissance, les gonades *Foxl2*$^{-/-}$ ont une taille réduite et sont composées d'ovocytes entourés d'une seule couche de cellules de la granulosa. Le défaut de prolifération de ces cellules perturbe la fragmentation des nids ovigères. Cela est à l'origine de blocage de la folliculogenèse conduisant au développement d'une IOP chez ces souris (Uda *et al*, 2004).

Lorsque la séquence codante pour FOXL2 ainsi qu'une partie de la région 3'UTR (Untranslated Transcribed Region) est remplacée par le gène rapporteur *LacZ* (par knock-in), des défauts crânio-faciaux sont également observés. D'un point de vue gonadique, les cellules de la granulosa ne subissent pas leur changement morphologique caractéristique (d'aplatie à cuboïdale) qui a lieu lors de l'évolution des follicules de primordiaux à primaires. De ce fait, les ovocytes ne sont jamais entourés de plus de deux couches de cellules de granulosa et aucun

follicule secondaire n'est observé. A l'âge adulte, les ovaires des animaux XX mutants sont plus petits et dépourvus d'ovocytes matures. L'absence de croissance folliculaire conduit à l'infertilité de ces femelles (Schmidt *et al*, 2004). Les défauts ovariens associés au syndrome BPES semblent donc être la conséquence d'une anomalie des cellules de la granulosa au moment de la formation des follicules.

Ces deux études montrent que, chez la souris, FOXL2 n'est pas impliqué dans la différenciation précoce de l'ovaire. Néanmoins, alors que l'une met en évidence une fonction de FOXL2 dans la fragmentation des cordons ovigères (Uda *et al*, 2004), l'autre pointe un rôle sur le maintien du stock de follicules primordiaux et la transition vers le stade de follicule primaire (Schmidt *et al*, 2004). Cette différence de phénotype peut s'expliquer par le fait que le fond génétique des souris utilisées n'est pas le même dans ces deux études.

En plus de son implication dans la folliculogenèse et donc dans la morphogenèse de la gonade femelle, FOXL2 exerce aussi un rôle direct dans l'inhibition de la voie de différenciation mâle. Une expression anormale de *Sox9* est en effet observée dans les ovaires *Foxl2*$^{-/-}$ avec un profil similaire à celui observé pour FOXL2 dans les ovaires contrôles. Cela suggère que dans ces gonades, les cellules qui devaient exprimer FOXL2 se mettent à exprimer SOX9 (Ottolenghi *et al*, 2005). Il apparait donc que, comme la voie RSPO1/WNT4/β-caténine, FOXL2 inhibe l'expression de *Sox9* dans les gonades XX afin de protéger le destin femelle.

Ce rôle de gardien de l'identité femelle des cellules de la granulosa a été confirmé par des travaux étudiant le devenir de gonades XX dont l'expression de *Foxl2* est supprimée de façon conditionnelle en période adulte. La transdifférenciation des cellules de la granulosa en cellules de Sertoli est en effet observée chez ces souris. Ainsi, dès que la protéine FOXL2 est totalement absente (environ deux jours après avoir invalidé le gène), l'expression de *Sox9* apparait, conduisant à la formation de structures pouvant s'apparenter à des tubules séminifères. Des cellules similaires à des cellules de Sertoli sont encore présentes plusieurs mois après la suppression de FOXL2 indiquant que la reprogrammation cellulaire est stable (Uhlenhaut *et al*, 2009). Ces travaux montrent que FOXL2 exerce une fonction pérenne en empêchant l'expression de SOX9, garantissant ainsi l'identité des cellules de la granulosa tout au long de la vie.

Des travaux se sont également intéressés à l'effet de la perte de *Foxl2* combinée à celle d'un autre gène. Ainsi, les souris déficientes pour *Foxl2* et *Rspo1* développent des ovotestis et présente un épididyme plus développé que les souris déficientes uniquement pour *Rspo1*. De

plus, cette double délétion entraine, dès 15.5 j*pc*, la présence d'un plus grand nombre de cellules semblables à des Sertoli et de cellules exprimant CYP17 (Auguste *et al*, 2011). La délétion combinée de *Foxl2* et *Wnt4* a quant à elle pour conséquence la présence d'un plus grand nombre de cordons exprimant *Sox9* et *Amh* à la naissance chez les souris XX double-mutantes. Ces gonades présentent des ovocytes en prophase I au niveau du cortex mais aussi des tubules avec des spermatogonies au niveau de la partie médullaire. L'expression des gènes mâles atteint des niveaux similaires à ceux observés chez les XY contrôles alors que la délétion de *Wnt4* seul n'entrainait qu'une petite augmentation de l'expression. La perte de *Wnt4* et *Foxl2* conduit donc à une augmentation précoce des gènes testiculaires (Ottolenghi *et al*, 2007).

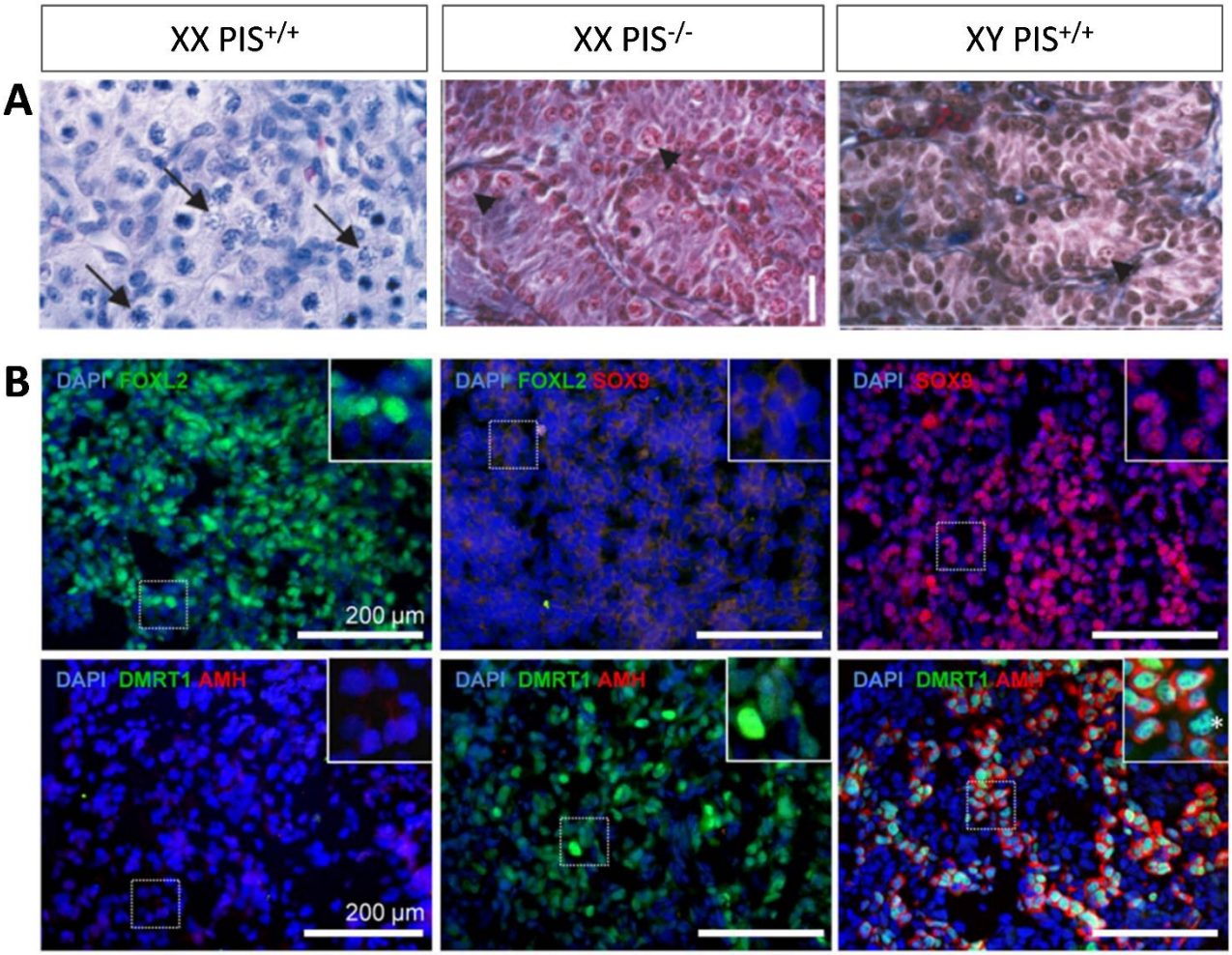
Ces deux études montrent donc que la délétion de *Rspo1* ou de *Wnt4* conjointement avec *Foxl2* impacte de façon plus importante le développement ovarien que la délétion de *Foxl2* seul.

c. Cibles de FOXL2 dans l'ovaire de souris

Dans l'ovaire post-natal de souris, l'analyse des cibles de FOXL2 par ChIP-seq montre notamment que le maintien de l'identité des cellules de la granulosa passe par une régulation de la signalisation des œstrogènes puisque le récepteur *Esr2* et *Cyp19a1* font partie des cibles (Georges *et al*, 2014).

Bien que FOXL2 n'apparait pas exercer de rôle dans la détermination puis la différenciation ovarienne au cours de la vie fœtale chez la souris, il présente pourtant de nombreuses cibles identifiées à 14.5 j*pc* (plus de 11 000 pics) et notamment des gènes impliqués dans la différenciation de l'ovaire. Ainsi, la follistatine est par exemple une cible de FOXL2 (Nicol *et al*, 2018). La régulation de l'expression de *Fst* chez la souris, avait déjà été suggérée. Alors que la transfection de BMP2 et FOXL2 dans des cellules dérivées de tumeurs ovariennes permettait l'augmentation de l'expression de *Fst*, celle-ci est fortement diminuée dans des gonades XX *Foxl2*$^{-/-}$. Cet effet est retrouvé à 13.5 j*pc* et à la naissance alors que l'absence de *Wnt4* a un effet uniquement à 13.5 j*pc*. La double délétion de ces deux gènes conduit quant à elle à la perte complète de l'expression de *Fst* à 13.5 j*pc* et à la naissance. Il apparait ainsi que WNT4 soit nécessaire à l'initiation de l'expression de la follistatine alors que FOXL2 et BMP2 sont requis pour le maintien dans le temps de cette expression (Kashimada *et al*, 2011).

Dès la vie fœtale, FOXL2 exerce déjà un rôle d'inhibiteur de la voie mâle puisque des gènes exprimés par les cellules de Sertoli tels que *Dmrt1*, *Fgf9* et *Cyp26b1* sont aussi des cibles de FOXL2 à 14.5 j*pc*. Bien qu'une fixation de FOXL2 ne soit pas observée dans le gène *Sox9*,



<u>Figure 24.</u> Histologie des gonades de chèvres XX PIS$^{-/-}$.
(**A**) Coupes de gonades XX PIS$^{-/-}$ en comparaison à des gonades XX PIS$^{+/+}$ et XY PIS$^{+/+}$. Les gonades XX mutantes ont une organisation similaire à celles des gonades XY non mutantes. (**B**) Détection par immunofluorescence de FOXL2, SOX9, DMRT1 et AMH sur ces gonades. Les gonades XX PIS$^{-/-}$ n'expriment plus FOXL2 mais expriment déjà DMRT1 avant SOX9.
*Issu de Pailhoux et al., 2002 (A) et de Elzaiat et al., 2014 (**B**).*

une fixation est détectée au niveau de l'Enh8 (Nicol *et al*, 2018), qui était plutôt actif dans l'ovaire (Gonen *et al*, 2018).

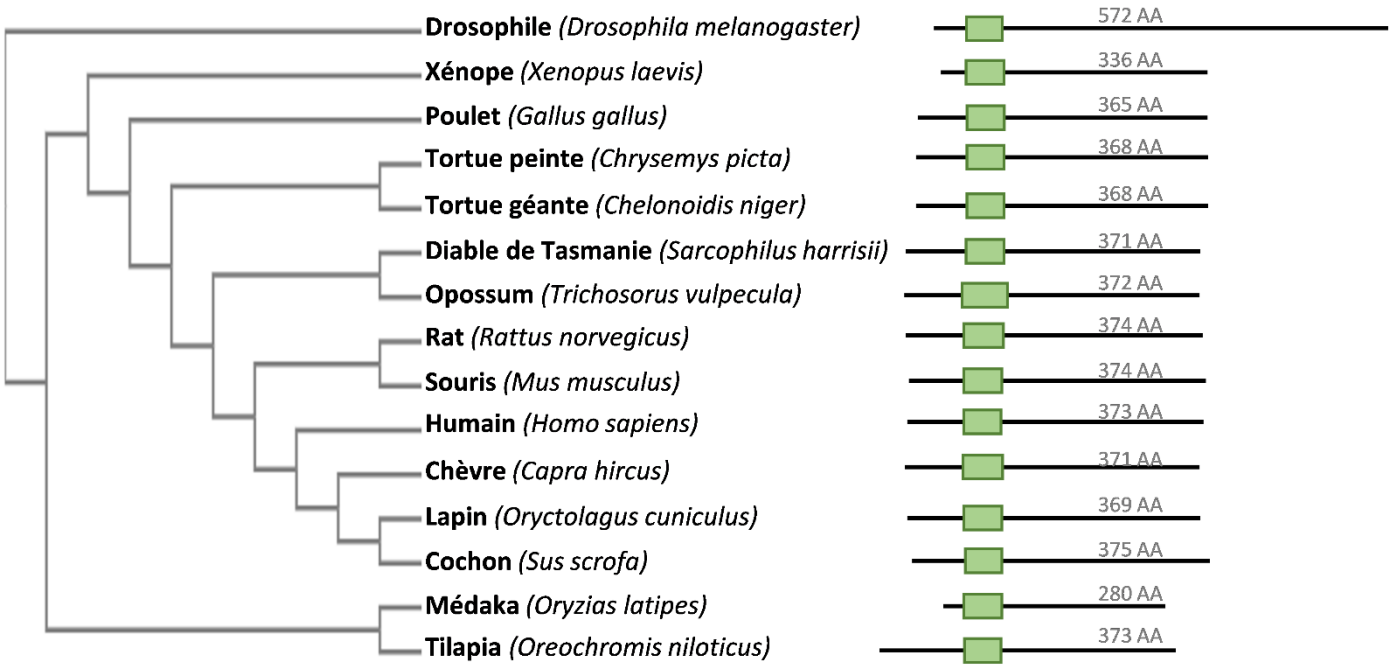
d. Rôles de FOXL2 dans l'ovaire de chèvre

Chez la chèvre, FOXL2 exerce un rôle plus précoce au cours de la différenciation ovarienne et peut être considéré comme un déterminant ovarien. Dans l'espèce caprine, FOXL2 est en effet impliqué dans un syndrome appelé PIS (Polled Intersex Syndrome). La mutation PIS induit l'absence de pousse des cornes dans les deux sexes, dès l'état hétérozygote (dominante), associée à une inversion sexuelle de type mâles XX chez les XX PIS$^{-/-}$ (récessif et limitée à un seul sexe génétique). Dans les gonades XX homozygotes mutantes pour PIS, *FOXL2* n'est pas exprimé, ce qui conduit à la différenciation de testicules XX **(Figure 24A)** producteurs d'androgènes (masculinisation du tractus génital) et ainsi à l'obtention d'individus mâles XX à la naissance. Ces mâles seront néanmoins stériles : leurs tubes séminifères sont dépourvus de cellules germinales (dégénérescence par apoptose avant la naissance) (Pailhoux *et al*, 2002).

La caractérisation de cette mutation s'est avérée complexe. Initialement décrite comme une délétion d'une région non codante de 11.7 kb située à 300 kb du gène *FOXL2* (Pailhoux *et al*, 2001), les techniques de séquençages haut-débit ont récemment montré qu'il s'agissait en fait d'une délétion un peu plus courte (10.4 kb) et d'une insertion d'une région d'environ 500 kb issue d'une duplication du chromosome 1 sur lequel est localisé *FOXL2* (Simon *et al*, 2020; Zhang *et al*, 2020). Par ailleurs, dans le cadre de la mutation PIS, en plus de l'expression de *FOXL2*, celle de trois autres gènes, correspondant à des ARN non codants longs, est affectée (Pailhoux *et al*, 2001; Pannetier *et al*, 2005, 2012). Afin de clarifier l'implication de FOXL2 (et de lui seul) dans la détermination de la gonade femelle, des fœtus de chèvre déficients pour ce gène ont été générés, grâce à l'utilisation de Zinc-Finger Nuclease (Boulanger *et al*, 2014). Un seul fœtus XX doublement muté pour *FOXL2* a pu être obtenu, mais celui-ci présentait une absence de paupière (comme chez la souris) et un développement testiculaire tout à fait comparable à un mâle XY du même stade, avec en particulier : (i) des cordons séminifères dont les cellules bordantes exprimaient SOX9, DMRT1 ou l'AMH (Sertoli-like), (ii) des cellules germinales au sein des cordons qui n'étaient pas en méiose et (iii) des cellules stéroïdogènes dans l'espace interstitiel exprimant CYP17 (Leydig-like) productrices d'androgènes comme en témoignait l'observation du sinus génital externe parfaitement masculinisé. Ainsi, chez la chèvre, FOXL2 est un déterminant de la différenciation ovarienne (Boulanger *et al*, 2014).

Une caractérisation plus fine de cette inversion sexuelle, notamment d'un point de vue transcriptomique, a permis de mieux comprendre le rôle de FOXL2 dans les premiers stades de différenciation de l'ovaire chez la chèvre. En effet, l'analyse des transcriptomes de gonades au moment de la détermination du sexe, a montré que, parmi les gènes dérégulés en l'absence de *FOXL2*, la majorité d'entre eux sont associés à la voie mâle. Au cours du développement ovarien, FOXL2 agit donc principalement en tant qu'inhibiteur des gènes impliqués dans la différenciation testiculaire. Parmi les gènes de la voie mâle présentant une expression augmentée dans les gonades XX PIS$^{-/-}$, il y avait des gènes codant pour des enzymes de la stéroïdogenèse (*CYP11A* et *17βHSD3*) mais surtout *DMRT1*, alors qu'à ce stade, l'expression de SOX9 n'est pas encore augmentée. En histologie aussi, des cellules exprimant DMRT1 sont observées alors que des cellules exprimant SOX9 ne sont pas encore observées **(Figure 24B).** Par la suite, l'augmentation progressive de l'expression de *SOX9* conduit à la formation de cordons facilement identifiables au sein des gonades XX PIS$^{-/-}$. Ces cordons sont composés de cellules de Sertoli exprimant SOX9 et DMRT1 dans leur noyau et l'AMH dans le cytoplasme de façon similaire aux testicules contrôles (Elzaiat *et al*, 2014). FOXL2 inhibe la voie de différenciation mâle en empêchant la différenciation des cellules de Sertoli et la stéroïdogenèse mâle. FOXL2 protège aussi la différenciation des cellules germinales femelles en inhibant l'expression de CYP26B1 (Elzaiat *et al*, 2014).

Par ailleurs, le fait que *DMRT1* soit exprimé avant *SOX9* dans les gonades XX homozygotes mutantes (XX PIS$^{-/-}$) en cours d'inversion sexuelle suggère que DMRT1 pourrait agir en tant qu'activateur de *SOX9* en l'absence de SRY afin d'engager une différenciation testiculaire. C'est ainsi que l'intérêt a été porté au gène *DMRT1*, qui apparait comme étant crucial pour la détermination testiculaire chez de nombreuses espèces, sauf chez les rongeurs.



<u>Figure 25.</u> Arbre phylogénétique et structure des protéines DMRT1.
L'arbre phylogénétique a été obtenu grâce à l'alignement des séquences issues d'Uniprot (https://www.uniprot.org/) avec l'outil CLUSTAL (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). La localisation du domaine DM (rectangle vert) est issue des données Uniprot ou de NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/) pour la Drosophile et le Tilapia.

CHAPITRE IV

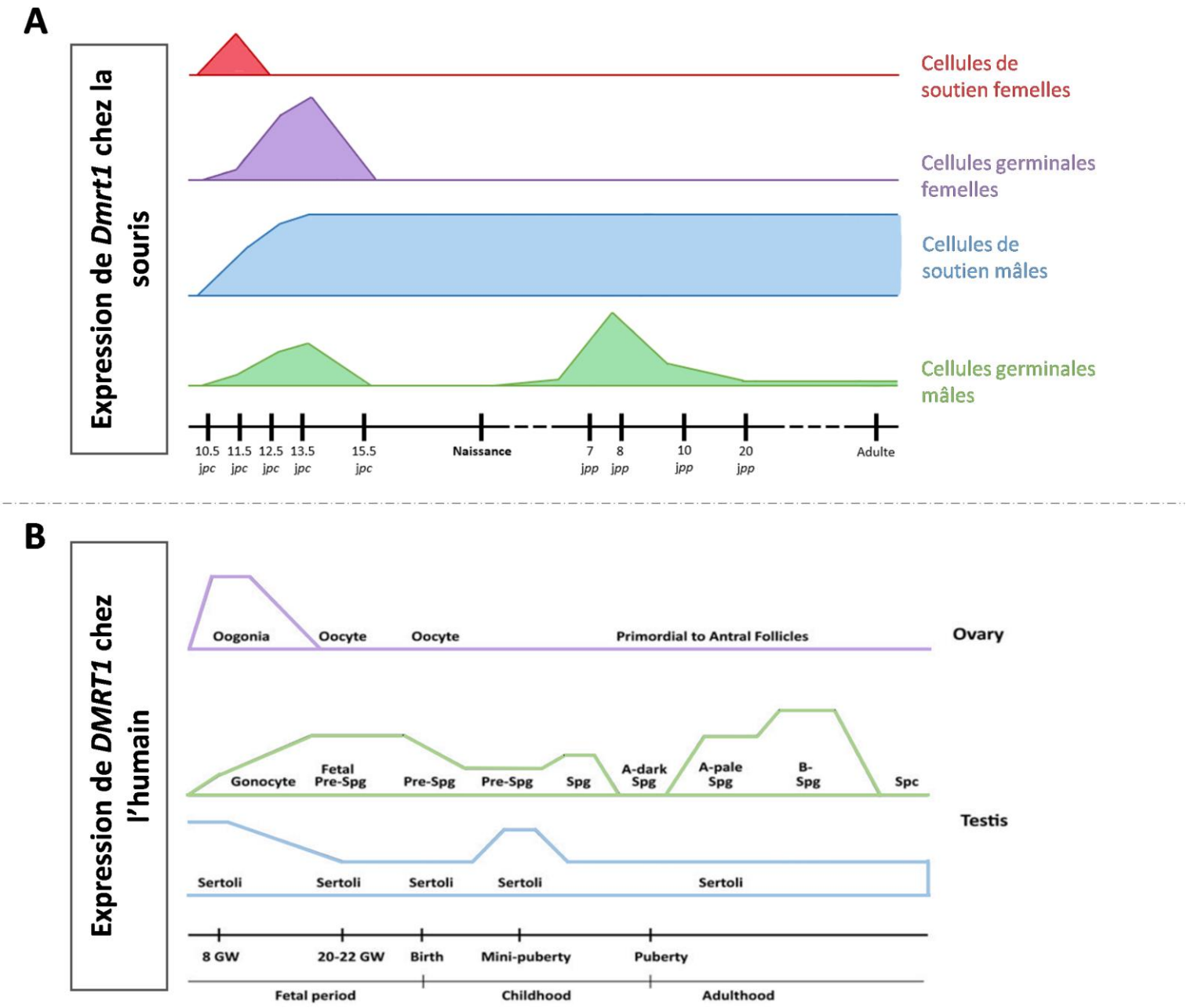
DMRT1, un facteur clé de la fonction testiculaire

Chez les mammifères, le gène *DMRT1* est composé de 5 exons et code pour un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines DMRT, présentant divers rôles au cours de la différenciation puis du développement gonadique. Alors que chez la Drosophile, la protéine fait 572 acides aminés, chez les autres espèces, elle fait généralement entre 365 et 375 acides aminés **(Figure 25)**.

A) La famille de protéines DMRT

Les facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines DMRT contiennent tous un domaine de fixation à l'ADN riche en résidus cystéines appelé le domaine DM. Ce domaine fait généralement entre 45 et 50 acides aminés et est hautement conservé au cours de l'évolution **(Figure 25)**. Il a pu être identifié pour la première fois au sein du gène *dsx* (doublesex) de la drosophile. Ce gène, requis pour la différenciation sexuelle somatique, code pour des transcrits de tailles différentes obtenus par épissage alternatif spécifique du sexe. Le transcrit femelle est ainsi composé de quatre exons alors que le transcrit mâle en a cinq. Ces deux transcrits ont en commun les trois premiers exons (Burtis & Baker, 1989). La caractérisation de ces transcrits a permis la mise en évidence d'un domaine de liaison à l'ADN au niveau de la région commune aux deux sexes. Ce domaine de liaison en doigts de zinc était distinct d'autres initialement décrits et ses résidus cystéines étaient cruciaux pour la capacité de liaison à l'ADN (Erdman & Burtis, 1993). Une autre étude a par la suite permis l'identification de *mab-3* chez *C.elegans*, nécessaire à la différenciation du lignage spécifique au mâle (Shen & Hodgkin, 1988) et codant pour une protéine composée d'un domaine similaire à celui de *dsx*. C'est alors que ce motif de fixation à l'ADN a été nommé domaine DM pour *Dsx* et *Mab-3*. Ces travaux ont aussi identifié une protéine à domaine DM avec une expression uniquement dans le testicule humain. Ce gène initialement appelé *DMT1* (DM domain gene expressed in testis) puis DMRT1 est localisé sur l'extrémité distale du bras du court du chromosome 9 chez l'humain (Raymond *et al*, 1998). Cette même équipe a ensuite mis en évidence la présence d'un homologue de *DMRT1* chez la souris au sein du chromosome 19 (Raymond *et al*, 1999).

Il y a désormais 8 gènes *DMRT* (1 à 8) connus chez les mammifères (Bellefroid *et al*, 2013; Zhang & Zarkower, 2017). Plusieurs d'entre eux sont conservés chez les marsupiaux



<u>Figure 26.</u> Profils d'expression de *Dmrt1*/*DMRT1* chez la souris et l'humain.
(**A**) Chez la souris, *Dmrt1* est exprimé dans les cellules somatiques des deux sexes dès 10.5 j*pc*. Cette expression va rapidement disparaitre des cellules somatiques ovariennes mais va persister dans les cellules de Sertoli tout au long du développement testiculaire puis tout au long de la vie. *Dmrt1* est également exprimé dans les cellules germinales. Dans l'ovaire, il atteint un maximum d'expression à 13.5 j*pc* avant de disparaitre à 15.5 j*pc*. Dans le testicule, le profil d'expression en période fœtale est assez similaire à celui observé dans l'ovaire. En revanche, *Dmrt1* est à nouveau exprimé en période post-natale, juste après la sortie de quiescence des spermatogonies. Il sera fortement exprimé dans ces spermatogonies à 7-8 j*pp* puis diminuera. A l'âge adulte, *Dmrt1* est uniquement retrouvé au niveau des spermatogonies souches. (**B**) Chez l'humain, *DMRT1* est aussi exprimé dans les ovogonies en période fœtale puis disparaît. Dans les cellules de Sertoli, il reste aussi exprimé pendant toute la vie. Enfin, dans les cellules germinales mâles, *DMRT1* est retrouvé à presque tous les stades de développement des spermatogonies.
*Adapté de Jorgensen et al., 2012 (**B**).*

(Pask *et al*, 2003) ou chez les monotrèmes (El-Mogharbel *et al*, 2007). Ces gènes *DMRT* ont des fonctions décrites notamment dans le développement gonadique mais aussi dans le développement du système nerveux ou des muscles. Ceci sera expliqué un peu plus en détails dans la **partie F)** de ce chapitre.

B) Analyse de l'expression de DMRT1

Comme indiqué précédemment, chez l'humain, *DMRT1* est localisé au niveau du bras court du chromosome 9. Or, des délétions de cette zone chez les individus XY sont associées à des 46, XY DSD avec dysgénésie gonadique (Veitia *et al*, 1997). *DMRT1*, constituant alors un nouveau gène candidat impliqué dans la détermination testiculaire, plusieurs études pour caractériser son expression gonadique ont été menées. Les premiers travaux d'analyse de l'expression de *DMRT1* ont porté sur des gonades de souris, puis sur des gonades humaines.

1. Expression de Dmrt1 dans les gonades de souris

Chez la souris, il est ainsi exprimé de façon identique aux deux sexes avant la détermination sexuelle puis commence à diminuer dans l'ovaire en développement à partir de 14.5 j*pc* pour devenir progressivement spécifique au testicule. De façon intéressante, chez les individus XY, l'expression de *Dmrt1* est limitée aux cordons séminifères dans les deux types cellulaires, les cellules de Sertoli et les cellules germinales (Raymond *et al*, 1999). Une autre étude a permis d'approfondir la caractérisation de ce profil d'expression chez la souris. En période fœtale, la protéine DMRT1 est retrouvée dans les cellules germinales XX et XY dès 11.5 j*pc*, atteint un maximum à 13.5 j*pc* avant de disparaitre à 15.5 *jpc*. Dans les cellules somatiques en revanche, l'expression de *Dmrt1* devient spécifique du mâle dès 13.5 j*pc* et sera présente tout au long du développement testiculaire. En période post-natale, l'expression de *Dmrt1* n'a jamais été observée au sein des gonades XX. Dans les gonades XY, son expression est continue dans les cellules de Sertoli et réapparait dans les cellules germinales testiculaires au moment où elles sortent progressivement de leur état de quiescence. En période post-natale, DMRT1 est ainsi retrouvée à la fois dans les spermatogonies souches ou SSC (Spermatogonial Stem Cell) et dans les spermatogonies en prolifération (Lei *et al*, 2007) **(Figure 26A)**.

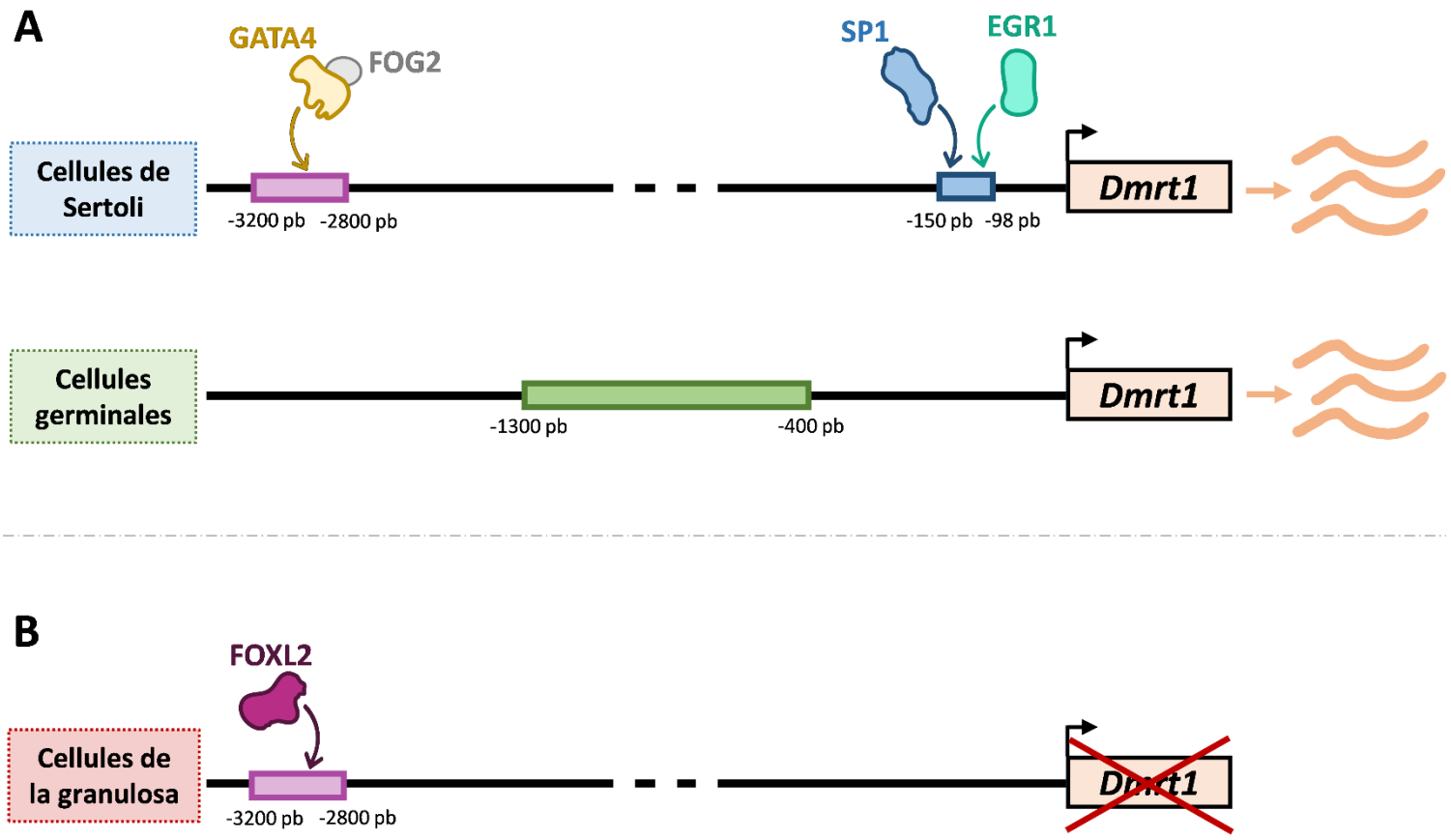


Figure 27. Régulation de l'expression de *Dmrt1* chez les rongeurs.
(**A**) Dans le testicule, différentes régions semblent être impliquées dans la régulation de *Dmrt1*. SP1 et EGR1 régulent son expression dans les cellules de Sertoli en se fixant à un promoteur à proximité du site d'initiation de la transcription (entre -150 et -98 pb). GATA4 et son coactivateur FOG2 sont aussi impliqués en se liant à une région plus distale, localisée entre -3 200 pb et -2 800 pb. Dans les cellules germinales, c'est la région située entre -1 300 pb et -400 pb qui est nécessaire à l'expression de *Dmrt1*. (**B**) Dans l'ovaire, FOXL2 est capable de se fixer à la région la plus distale afin d'empêcher l'expression de *Dmrt1* dans les cellules de la granulosa.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

2. *Expression de DMRT1 dans les gonades humaines*

D'autres travaux se sont aussi intéressés aux gonades humaines. Une expression spécifique dans les gonades des embryons XY a ainsi pu être mise en évidence. Alors qu'initialement, le profil de marquage de DMRT1 est similaire à celui de SRY, il sera par la suite retrouvé dans les tubules séminifères en formation et semble absent des cellules germinales (Moniot *et al*, 2000). Au fur et à mesure du développement gonadique, DMRT1 présente une expression majoritaire dans les cellules de Sertoli puis apparait aussi dans les pro-spermatogonies. Dans les ovaires, l'expression de *DMRT1* est en revanche spécifique aux ovogonies dès la formation des cordons sexuels puis s'éteint avant l'entrée en méiose. Dans les testicules adultes, l'expression est principalement détectée au niveau des noyaux des spermatogonies et des cellules de Sertoli. Chez l'homme, il existe deux types de spermatogonies : les A « sombres » destinées au renouvellement du stock de spermatogonies et les A « claires » qui deviendront des spermatogonies B puis des spermatocytes primaires après division. DMRT1 n'est exprimé que dans les spermatogonies « claires » et n'est pas détecté dans les spermatocytes post-méiotiques ni dans les spermatides (Jørgensen *et al*, 2012) **(Figure 26B)**.

De façon générale, DMRT1 présente donc une expression à la fois somatique et germinale et devient rapidement spécifique du mâle avec un profil dynamique au cours de la différenciation des cellules germinales.

3. *Régulation de l'expression de DMRT1*

Peu d'éléments sont connus au niveau de la régulation de son expression mais ceci a pu être étudié chez les rongeurs par une équipe américaine.

Il s'avère ainsi que l'activité transcriptionnelle du promoteur proximal de *Dmrt1* chez le rat fait appel à deux régions régulatrices, homologues à la séquence humaine. Ces régions sont localisées entre les nucléotides -3 200 et -2 000 et entre -150 et -98. L'analyse approfondie de la région la plus proche du site d'initiation de la transcription a mis en évidence la présence de site de fixation pour deux régulateurs transcriptionnels SP1 (Specific Protein 1) et EGR1 (Early Growth Response 1). La transcription de *Dmrt1* peut donc être régulée par SP1 et EGR1 (Lei & Heckert, 2002) **(Figure 27A)**.

Par la suite, la région entre -3 280 et -2 750 pb a été démontrée comme étant requise à l'activité du promoteur dans un système de culture primaire de cellules de Sertoli. La présence de sites de fixation pour GATA4 dans cette région distale du promoteur suggérait son implication dans la régulation de l'expression de *Dmrt1*. L'analyse d'embryons XY déficients pour *Fog2*, le principal coactivateur de GATA4, a pu conforter cette hypothèse. Une expression significativement plus faible de *Dmrt1* a en effet été observée dans les gonades XY *Fog2*$^{-/-}$ (Lei & Heckert, 2004).

L'importance de la région située à 3 200 pb en amont du site d'initiation de la transcription de *Dmrt1* a finalement été confirmée. En plus de contenir les séquences régulatrices nécessaires à l'expression de *Dmrt1* dans les cellules de Sertoli, elle contient également des éléments de réponse pour FOXL2. Sa fixation permet ainsi l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de *Dmrt1* dans les cellules de la granulosa **(Figure 27B)**. Une région spécifique à l'expression du gène dans les cellules germinales a aussi été identifiée. Cette région localisée à entre 400 et 1 300 pb en amont du site d'initiation de la transcription est active uniquement dans des testicules de souris issues de mères non traitées au busulfan. Ce traitement entraine en effet la perte de plus de 90% des cellules germinales au sein de la descendance issue des mères exposées au cours de la gestation. Le fait que l'activité de cette région ne soit pas détectée dans les gonades des souriceaux traités au busulfan confirme son implication spécifique dans les cellules germinales (Lei *et al*, 2009).

Chez les rongeurs, la région localisée entre -3 200 pb et -2 800 pb contrôle donc l'expression spécifique de *Dmrt1* dans les cellules de Sertoli alors que celle entre – 1 300 pb et -400 pb régule l'expression du gène dans les cellules germinales **(Figure 27A)**.

L'expression de *DMRT1* majoritaire dans le testicule, décrite ici chez la souris et l'humain, constituait un argument supplémentaire en faveur d'une implication au cours de la détermination testiculaire. D'autant plus que ce rôle a pu être confirmé chez de nombreuses espèces de vertébrés non mammaliens.

C) DMRT1, un TDF chez de nombreuses espèces de vertébrés

L'implication de *DMRT1* ou de ses orthologues au cours de la détermination gonadique a notamment été mise en évidence chez le médaka, le tilapia, le xénope et le poulet.

1. *DMY/DMRT1Y chez le médaka*

Le médaka présente un système de chromosomes sexuels XX/XY et l'orthologue de DMRT1 chez une des espèces de médaka (*Oryzias latipes*) a pu être identifié de façon similaire à la mise en évidence de *SRY*. L'analyse d'animaux avec diverses délétions du chromosome Y a mis en évidence que la perte d'une région de 250 kb conduisait au développement de femelles XY. Dans cette région, seul un gène était retrouvé spécifiquement dans les embryons XY et codait pour une protéine comportant un domaine DM. Ce gène a ainsi été nommé *DMY* (Matsuda *et al*, 2002).

La même année, un gène appelé *DMRT1Y* été retrouvé dans le locus impliqué dans la détermination sexuelle mâle. L'analyse de ce gène a ensuite montré qu'il correspondait à une version dupliquée du gène autosomal *DMRT1* de médaka avec une homologie de 96% avec le gène *DMY*. *DMRT1Y* et *DMY* correspondaient en réalité au même gène, la différence venant juste de souches de poisson différentes utilisées dans les deux études. Chez l'adulte, *DMRT1Y* est exprimé uniquement dans les testicules, tout comme le *DMRT1* autosomal. En revanche, en période fœtale, *DMRT1Y* est exprimé avant *DMRT1*. De façon intéressante, l'expression de *DMRT1Y* est retrouvée dans les ovaires de femelles XY à un niveau similaire à celui des testicules lorsque l'inversion sexuelle est induite par un traitement hormonal (Nanda *et al*, 2002). Ce gène semble donc se situer en amont des gènes dont l'expression est supprimée par le traitement hormonal.

L'analyse de l'effet de la surexpression de *DMY/DMRT1Y* chez des individus XX a pleinement confirmé l'importance de ce gène. L'ajout d'un transgène contenant DMY chez des poissons XX a conduit au développement testiculaire confirmant ainsi qu'il s'agissait d'un gène du déterminisme sexuel mâle chez le médaka (Matsuda *et al*, 2007).

Après la détermination sexuelle contrôlée par *DMY/DMRT1Y*, *DMRT1* est requis pour le maintien de la différenciation testiculaire chez le médaka. La génération de poissons mutants pour *DMRT1* a en effet conduit au développement de femelles XY. Les gonades XY homozygotes se développent comme des ovaires normaux et expriment *FOXL2* et *CYP19A1* (Masuyama *et al*, 2012).

2. *Dmrt1 chez le tilapia*

Chez le tilapia, où le gène *amhy* est supposé être le gène principal du déterminisme du testicule (Li *et al*, 2015), *dmrt1* semble exercer un rôle indirect sur la différenciation testiculaire.

Il apparait en effet que son rôle inhibiteur des gènes de la voie femelle puisse favoriser la voie mâle. Le domaine DM a pu être décrit comme étant essentiel pour réprimer l'expression de *cyp19a1a* codant pour l'enzyme aromatase et contrôlant la synthèse d'œstrogènes (Wang *et al*, 2010). Chez les poissons, les œstrogènes jouent en effet un rôle clé dans l'activation de la différenciation femelle (Piferrer *et al*, 1994; Lau *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2017). La surexpression de *dmrt1* chez des individus XX n'entraine pas de différenciation testiculaire mais conduit à des degrés variés de dégénérescence ovarienne et surtout à une diminution de la concentration sérique d'œstradiol (Wang *et al*, 2010). En revanche, les individus XY déficients pour *dmrt1* présentent une inversion du sexe avec une ovogenèse semblable à celle des femelles normales. Ce phénotype s'explique par une interaction antagoniste entre DMRT1 (exprimé dans les cellules de Sertoli et les spermatogonies) et FOXL3 (exprimé dans les cellules germinales ovariennes). Tandis que les poissons XX déficients pour *foxl3* développent des gonades où la spermatogenèse est initiée, la double délétion de *foxl3* et *dmrt1* n'a aucun effet sur le développement ovarien. Ainsi, dans les cellules germinales femelles, FOXL3 se fixe sur le promoteur de *dmrt1* afin d'inhiber sa transcription et permettre le développement ovarien normal. En revanche, dans les cellules germinales mâles, c'est DMRT1 qui régule négativement l'expression de *foxl3* permettant de ce fait le développement testiculaire (Dai *et al*, 2021).

3. DMRT1 et DM-W chez le xénope

Chez une espèce de xénope (*Xenopus laevis*), où ce sont les femelles qui ont le sexe hétérogamétique (système ZZ/ZW), un homologue de *DMRT1* a pu être identifié comme étant un gène spécifique des femelles avec un domaine DM : c'est le gène *DM-W*. Ce dernier est ainsi présent sur le chromosome W alors que deux gènes *DMRT1* (A et B) sont retrouvés sur les chromosomes 1 et 2. D'un point de vue phylogénétique, *DM-W* apparait être un paralogue de *DMRT1*. Ces deux gènes présentent une expression dynamique au cours du développement gonadique. *DM-W* est ainsi exprimé de façon spécifique dans les gonades ZW avant la détermination du sexe. *DMRT1* sera ensuite exprimé dans les gonades des deux sexes. Chez des individus ZZ, l'induction de l'expression de *DM-W* par transgénèse conduit, dans certains cas, au développement d'ovotestis suggérant une implication de ce gène dans le développement ovarien (Yoshimoto *et al*, 2008).

Finalement, il a été démontré que *DMRT1* et *DM-W* exerçaient des rôles opposés chez le xénope (Yoshimoto *et al*, 2010).

D'un côté, la perte de fonction de DM-W chez les individus ZW a pour conséquence, chez certains têtards, la formation de gonades sans cavité ovarienne et avec des cellules germinales en position médullaire comme chez les ZZ. A l'âge adulte, soit les ovaires de ces individus régressent, soit ils sont sous-développés. Ils possèdent peu de cellules germinales et ont une expression plus forte de *DMRT1* que les ZW non mutants. De façon intéressante, une morphologie testiculaire a pu être observée dans certaines gonades illustrant que la perte d'une partie de l'expression de *DM-W* pouvait conduire au développement mâle chez les ZW (Yoshimoto *et al*, 2010).

D'un autre côté, l'induction de l'expression de *DMRT1* chez des ZW conduit à la formation de gonades présentant un mélange de structures ovariennes et testiculaires (Yoshimoto *et al*, 2010).

Ainsi, chez le xénope, il apparait que *DMRT1* permet la formation testiculaire chez les ZZ. En revanche, chez les ZW, *DM-W* agit comme un dominant négatif de DMRT1 et permet la différenciation ovarienne (Yoshimoto *et al*, 2010).

4. DMRT1 chez le poulet

Chez le poulet, qui présente aussi un système chromosomique ZZ/ZW, *DMRT1* a pu être localisé sur le chromosome Z. L'effet de sa perturbation sur le développement gonadique a pu être étudié par deux stratégies différentes.

Avant l'avènement de nouvelles techniques d'édition du génome, la diminution de la production de protéine DMRT1 a été induite par l'utilisation de particules rétrovirales comportant un miRNA ciblant l'exon 3 ou bien par un shRNA ciblant le domaine DM. Ce virus portait également le gène GFP permettant de suivre sa propagation. Dans les deux cas, l'expression de DMRT1 était diminuée d'environ 80% et l'efficacité était inversement proportionnelle à l'expression de la protéine GFP. Les gonades exprimant fortement la GFP étaient ainsi celles avec une présence importante de virus et donc une expression significativement réduite de DMRT1. Les gonades exprimant moins la GFP présentaient en revanche une moindre réduction de DMRT1. De façon intéressante, les individus ZZ n'exprimant pas ou peu la GFP avaient un développement mâle normal. En revanche, ceux avec une forte expression de la GFP développaient des gonades féminisées et une atrophie de la gonade droite, typique du développement femelle chez les oiseaux où seule la gonade gauche devient un ovaire fonctionnel. La réduction de l'expression de *DMRT1* conduit donc au développement ovarien chez les poulets ZZ (Smith *et al*, 2009).

La délétion d'une copie de *DMRT1* a finalement été induite par CRISPR-Cas9. Les embryons ZW sont ainsi totalement dépourvus de DMRT1 ($Z^{D-}W$) alors que les embryons ZZ n'expriment plus qu'une seule copie ($Z^{D+}Z^{D-}$). Comme attendu, au vu des résultats présentés ci-dessus, les embryons $Z^{D+}Z^{D-}$ ont un développement gonadique typiquement ovarien. Du côté droit, la gonade est plus petite alors que du côté gauche, la gonade est similaire à celle observée chez un embryon ZW contrôle : les cellules germinales sont regroupées dans le cortex alors que les cellules exprimant FOXL2 et l'aromatase sont en position médullaire. De façon intéressante, les embryons $Z^{D-}W$ développent des ovaires mais le gauche est de plus petite taille que chez les ZW contrôles. L'analyse de l'expression de certains gènes a mis en évidence une forte diminution de *FOXL2* et de l'aromatase chez les $Z^{D-}W$. L'entrée en méiose des cellules germinales et le développement folliculaire ont également pu être étudiés. Dans l'ovaire gauche des ZW contrôles, γH2AX (H2A histone family member X), un marqueur des cassures doubles brins (Mahadevaiah *et al*, 2001), est fortement exprimé à 13.5 j*pc* puis diminue à 17.5 j*pc*. Au sein des gonades $Z^{D+}Z^{D-}$, son expression est observée aux mêmes stades montrant que les cellules germinales initient la méiose. En revanche, chez les $Z^{D-}W$ aucune expression de γH2AX n'est observée. Ainsi, dans l'ovaire de poulet, DMRT1 est nécessaire à l'entrée en méiose des cellules germinales femelles. Bien que des cellules exprimant γH2AX peuvent être observées chez les individus $Z^{D+}Z^{D-}$, seuls des petits follicules sont présents dans ces gonades mais des stades plus tardifs ne sont jamais observés. Alors que les $Z^{D+}Z^{D-}$ ont un défaut de folliculogenèse, les $Z^{D-}W$ ne l'initient pas du tout. Cela conduit à ce que les individus $Z^{D+}Z^{D-}$ et les $Z^{D-}W$ ne produisent pas d'œufs : ils sont infertiles. En plus de confirmer l'importance de *DMRT1* dans la détermination testiculaire chez le poulet, ces travaux illustrent aussi l'implication de *DMRT1* dans la différenciation des cellules germinales femelles et notamment dans leur entrée en méiose (Ioannidis *et al*, 2021).

5. Dmrt1 chez la tortue de Floride

En l'absence de chromosome sexuel, le sexe des animaux peut être déterminé en fonction de la température d'incubation des œufs. C'est le cas de la tortue de Floride (*Trachemys scripta*). La caractérisation de *Dmrt1* chez cette espèce montre la présence du domaine DM ainsi qu'une expression préférentielle dans les testicules. De façon intéressante, *Dmrt1* est retrouvé dans les gonades lorsque la température d'incubation produit des mâles (température basse à 26°C) alors que son expression diminue significativement et avant celles de *l'Amh* et de *Sox9* dès que la température augmente (31°C pour ne produire que des femelles).

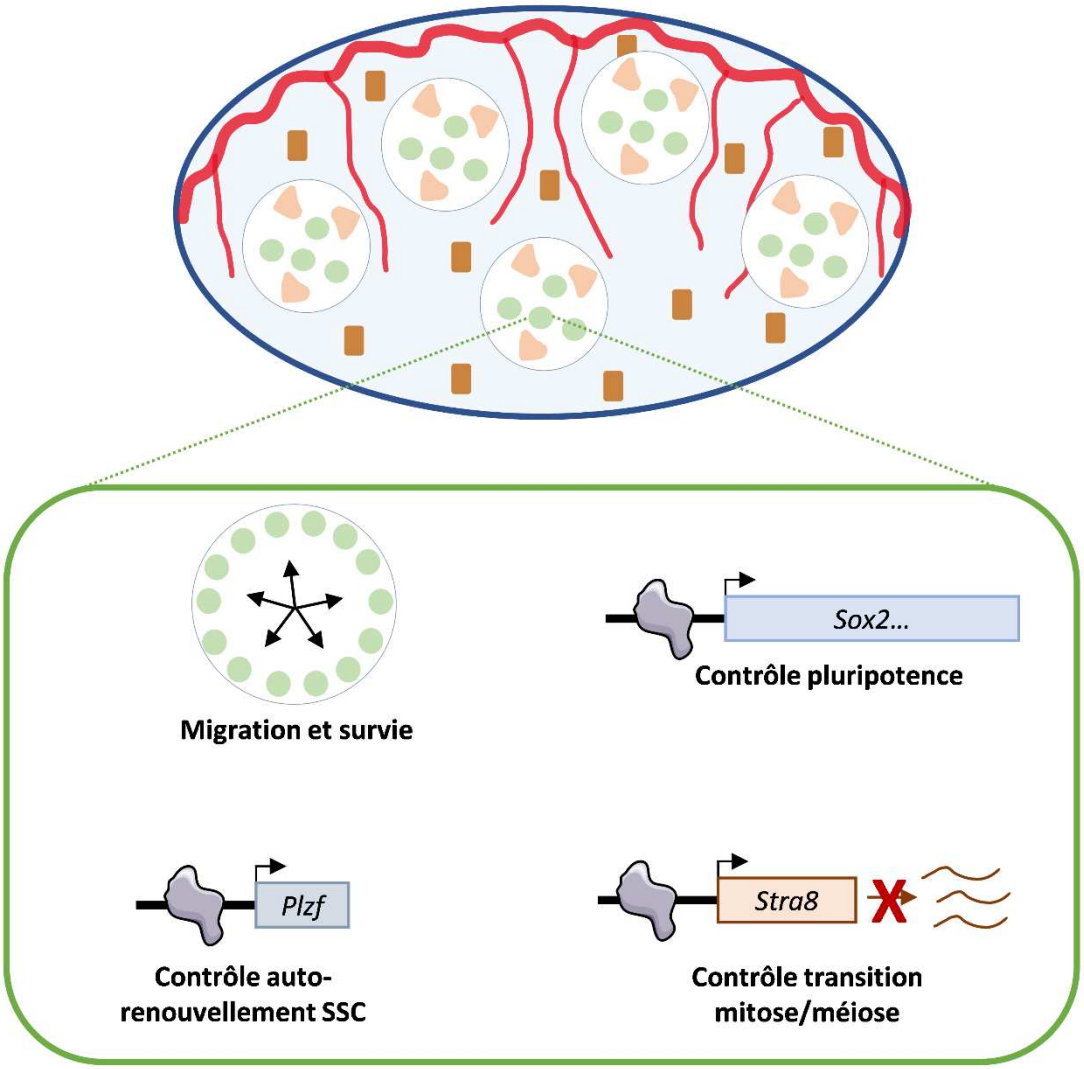
Une analyse par séquençage après traitement de l'ADN au bisulfite a permis de montrer que la méthylation du promoteur de *Dmrt1* était sensible à la température. Ainsi, lorsque des gonades sont placées d'une température favorable aux mâles vers une température favorable aux femelles, la méthylation du promoteur augmente fortement conduisant à la diminution de l'expression de *Dmrt1*. Inversement, le transfert d'une température pro-femelle vers une température pro-mâle conduit à une réduction rapide de la méthylation au niveau du promoteur (Ge *et al*, 2017).

DMRT1 est donc le TDF chez des espèces à détermination sexuelle contrôlée génétiquement mais il est aussi décrit comme étant crucial chez des espèces où la détermination sexuelle est contrôlée par l'environnement. Mais qu'en est-il du rôle de DMRT1 au cours du développement gonadique chez les mammifères ? Cela a principalement été étudié chez la souris et de nombreux travaux se sont intéressés à l'effet de la perte de DMRT1 chez cette espèce aussi bien chez le mâle que chez la femelle.

D) Quel(s) rôle(s) pour DMRT1 chez la souris ?

1. Implication au cours du développement testiculaire

Les premières études sur le rôle de *Dmrt1* chez les souris XY ont été publiées en 2000 et 2007 et s'intéressaient à l'effet de la perte totale du gène (knock-out total), conduisant à la perte de son expression à la fois dans les cellules somatiques et les cellules germinales. Bien que les souris XY *Dmrt1*$^{-/-}$ développent des testicules avec une morphologie normale jusqu'à la naissance, des défauts sont ensuite observés conduisant à la stérilité de ces mâles (Raymond *et al*, 2000). Dès 7 jours après la naissance, peu de cellules germinales exprimant le marqueur mitotique P-H3 (phospho-histone 3) ou le marqueur de cassures double brins γH2AX sont observées au sein des gonades XY *Dmrt1*$^{-/-}$. Ces observations suggèrent que ces cellules germinales sont peu actives mitotiquement et qu'elles ont une différenciation perturbée (Fahrioglu *et al*, 2007). De plus, à 10 j*pp*, ces cellules sont toujours au centre des tubules séminifères et n'ont pas migré à la périphérie du tubule où elles sont censées être localisées dès 2 j*pp*. Finalement à partir de 14 j*pp*, il n'y a que des cellules de Sertoli immatures qui sont observées dans des tubules séminifères dépourvus de lumière (Raymond *et al*, 2000; Fahrioglu *et al*, 2007). Les gonades XY *Dmrt1*$^{-/-}$ présentent par ailleurs des défauts de formation des jonctions serrées, essentielles à la morphologie testiculaire et notamment à la mise en place de



<u>Figure 28.</u> Rôles de DMRT1 dans les cellules germinales chez la souris.
Au niveau germinal, DMRT1 est impliqué dans leur migration à la périphérie des tubules, essentielle à leur survie. Il régule l'expression de gènes associés à la pluripotence tels que *Sox2* et également de *Plzf*, gène crucial au contrôle de l'auto-renouvellement des cellules souches spermatogoniales (SSC). Finalement, en se liant au niveau du promoteur de *Stra8*, il empêche son expression, inhibant ainsi une entrée en méiose prématurée.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

la barrière hémato-testiculaire. En effet, un marquage pour l'occludine est observé à 14 j*pp* mais celui-ci est diffus et non organisé par rapport au marquage observé sur des coupes de testicules contrôles. A ce même stade, aucun marquage pour la claudine-11 n'est observé alors que les agrégats de ZO-1 (Zona Occludens-1) sont retrouvés au centre du tubule et non à la périphérie où ils forment des jonctions serrées continues chez les animaux contrôles (Fahrioglu *et al*, 2007). Ces premières observations suggéraient donc une importance de DMRT1 dans le développement post-natal du testicule avec notamment une implication dans la mise en place d'une architecture correcte des tubes séminifères nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse.

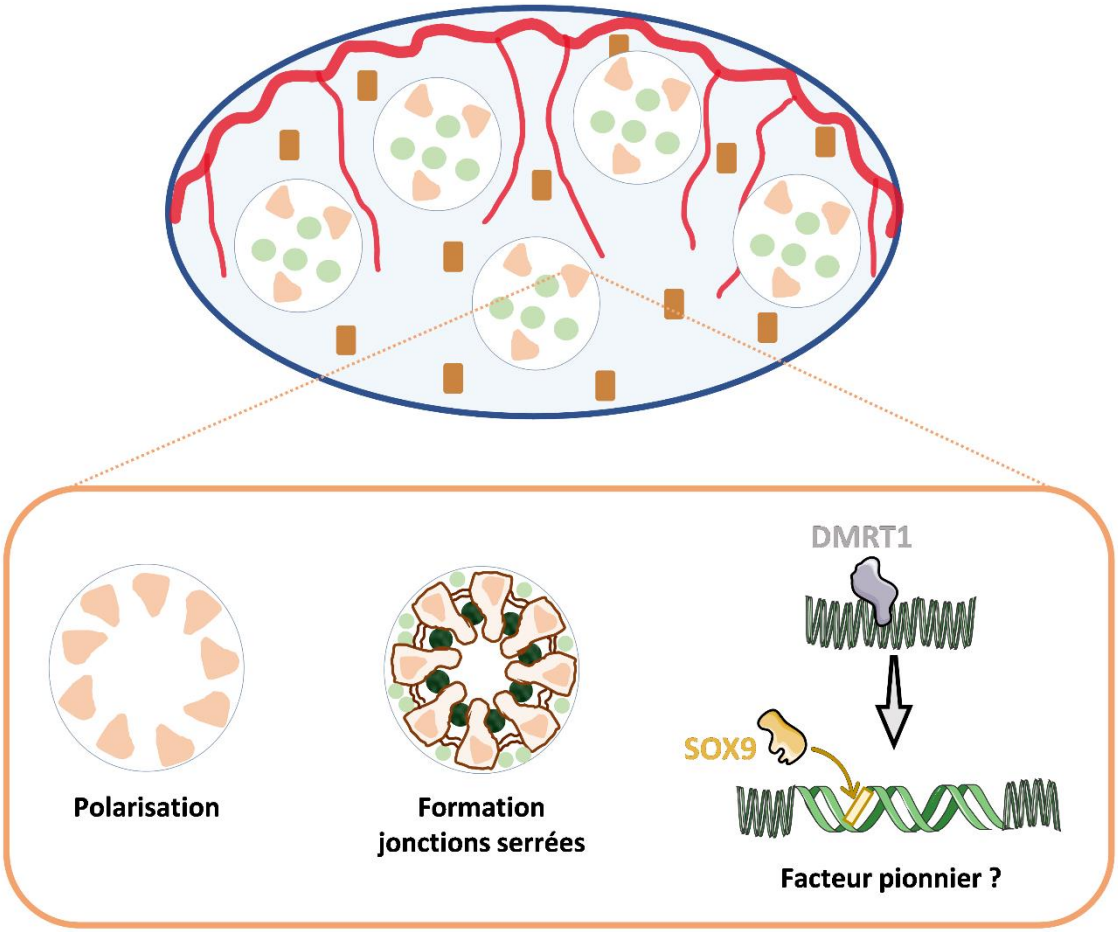
Par la suite, nous nous intéresserons successivement aux rôles de DMRT1 dans les cellules germinales mâles et dans les cellules de Sertoli.

a. DMRT1 et pro-spermatogonies/spermatogonies

La suppression de *Dmrt1* de façon spécifique dans les cellules germinales à différents stades de leur différenciation a permis d'expliciter ses fonctions dans ce type cellulaire. Il est ainsi requis pour : (i) leur relocalisation et ainsi leur survie à la base des tubes ; (ii) la régulation de l'auto-renouvellement et de la prolifération des SSC ; (iii) le contrôle des gènes associés à la pluripotence ; et, (iv) le contrôle de leur différenciation via la régulation de la transition mitose/méiose **(Figure 28)**.

Lorsque la perte de *Dmrt1* est induite très précocement, dès le stade CGP, les cellules germinales sont incapables de migrer à la périphérie des tubules. N'étant pas correctement localisées, ces cellules ne survivent pas conduisant à l'observation de tubules dépourvus de cellules germinales. DMRT1 est donc important pour leur migration radiale à des cellules germinales, cruciale à leur survie (Kim *et al*, 2007).

Ce rôle de migration à la périphérie des tubules est intimement lié à l'implication de DMRT1 dans la mise en place d'une niche fonctionnelle de spermatogonies capable de supporter la spermatogenèse. Cela a pu être mis en évidence par l'analyse des gonades où l'expression de *Dmrt1* est supprimée uniquement dans les SSC. Le système utilisé permettait d'induire la perte de DMRT1 avec une injection de tamoxifène, mais surtout il était possible de suivre les cellules où la recombinase Cre était active grâce à un marquage rouge (Tomato). Ainsi, au sein de ces gonades, les spermatogonies sont capables de se différencier correctement et d'entrer en méiose. En revanche, 21 jours après l'injection du tamoxifène, environ 40% des



<u>Figure 29.</u> Rôles de DMRT1 dans les cellules de Sertoli chez la souris.
Au niveau somatique, DMRT1 est essentiel à la polarisation des cellules de Sertoli. Il est aussi impliqué dans la formation des jonctions serrées permettant la formation d'un environnement particulier pour le développement des cellules germinales. Finalement, DMRT1 est requis pour le maintien de l'identité cellulaire des cellules de Sertoli. Cela semble passer par sa potentielle action en tant que facteur pionnier pour SOX9, lui facilitant l'accès à ses gènes cibles.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

tubules ne contiennent pas de cellules positives pour Tomato. Ce pourcentage monte à 60% au bout de 40 jours. L'absence de *Dmrt1* dans les SSC conduit donc à une perte progressive de ces cellules. De façon intéressante, les spermatogonies mutantes n'expriment pas PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger), un marqueur connu de la maintenance des SSC. Cela suggère donc que DMRT1 est requis pour maintenir l'expression de PLZF dans les spermatogonies indifférenciées. En réalisant des expériences de ChIP, les auteurs ont pu confirmer que DMRT1 peut réguler l'expression de *Plzf* en se liant à proximité de son promoteur (Zhang *et al*, 2016). Par ailleurs, le domaine DM de DMRT1 est aussi capable d'interagir avec le domaine BTB de la protéine PLZF. La diminution de l'expression de DMRT1 ou de PLZF conduit ainsi à une réduction significative de la prolifération des cellules souches germinales mâles (Wei *et al*, 2020). Par le biais de son interaction avec PLZF, DMRT1 est essentiel à l'auto-renouvellement et à la prolifération des cellules souches.

La suppression de *Dmrt1* dans les spermatogonies indifférenciées est quant à elle associée à la réduction du nombre des cellules germinales conduisant à la diminution de la taille des testicules. Bien qu'en nombre diminué, les cellules germinales présentes sont capables de réaliser la méiose puisque des spermatocytes et des spermatides sont observés. Dans les spermatogonies, DMRT1 se fixe au niveau du promoteur de *Stra8* afin d'inhiber sa transcription. Cela empêche ainsi la méiose pendant les phases de prolifération par mitose puis de différenciation des spermatogonies. Dans les stades plus tardifs, DMRT1 n'est plus exprimé dans les cellules germinales permettant ainsi à STRA8 de déclencher la méiose (Matson *et al*, 2010).

Le rôle de DMRT1 dans le contrôle des gènes associés à la pluripotence sera détaillé dans le paragraphe « d » puisque cette fonction semble dépendre du fond génétique.

b. DMRT1 et les cellules de Sertoli

L'expression de DMRT1 dans les cellules de Sertoli est nécessaire à leur polarisation à la périphérie des tubules ainsi qu'à la formation des jonctions serrées essentielle à la mise en place de la barrière hémato-testiculaire. Son expression tout au long de la vie permettra le maintien de l'identité cellulaire des cellules de Sertoli **(Figure 29)**.

Lorsque la perte de *Dmrt1* est induite uniquement dans les cellules de Sertoli, la migration des cellules germinales à la base des cordons n'est pas impactée. En revanche, les cellules de Sertoli ne s'organisent pas correctement, conduisant à l'observation de ces cellules

de façon aléatoire au sein des tubules. Cette désorganisation ne permet pas la formation d'un espace luminal au cœur du tubule puisque les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont mélangées dans tout le tubule. Bien quand dans ces testicules désorganisés, les cellules germinales soient capables d'initier la méiose, leur progression méiotique va rapidement être impactée (Kim *et al*, 2007). Comme indiqué au début du **paragraphe 1.**, deux protéines des jonctions serrées (claudine-11 et ZO-1) ont une expression perturbée en l'absence de *Dmrt1* (Fahrioglu *et al*, 2007). Le défaut de polarisation des cellules de Sertoli dans les gonades *Dmrt1*$^{-/-}$ perturbe la mise en place de la barrière hémato-testiculaire, cruciale à la mise en place d'un environnement optimal au déroulement de la spermatogenèse. DMRT1 est donc nécessaire à la morphogenèse testiculaire permettant ainsi aux cellules de Sertoli d'assurer leur rôle de soutien à la lignée germinale pendant la méiose/spermatogénèse.

L'analyse de gonades XY dans lesquelles *Dmrt1* n'est supprimé que dans les cellules de Sertoli a mis en évidence son importance dans le testicule post-natal en tant que gardien de l'identité des cellules de Sertoli.

Des cellules positives pour FOXL2 sont en effet observées dans ces gonades *Dmrt1*$^{-/-}$ dès 14 j*pp* alors qu'il y a encore de nombreuses cellules positives pour SOX9. En revanche, à 28 j*pp*, le nombre de cellules marquées pour FOXL2 augmente considérablement alors que celles marquées pour SOX9 sont de moins en moins présentes. Cela est associé à la diminution de l'expression des gènes impliqués dans la voie mâle tels que *Ptgds*, *Sox8* et *Sox9* et à l'augmentation de *Foxl2*, *Esr1* (Estrogen Receptor 1), *Wnt4* et *Rspo1*. Ces travaux illustrent donc la transdifférenciation des cellules de Sertoli en cellules de la granulosa en l'absence de DMRT1 (Matson *et al*, 2011).

La délétion de *Foxl2* au sein de testicules *Dmrt1*$^{-/-}$ a confirmé que la transdifférenciation était causée par l'expression de FOXL2. En effet, la transdifférenciation des cellules de Sertoli n'est pas observée au sein de ces gonades doubles mutantes. Les cellules de Sertoli ne sont néanmoins pas totalement polarisées et n'expriment pas le récepteur aux androgènes. DMRT1 est ainsi nécessaire à la différenciation complète de ces cellules et il permet le maintien de leur identité, notamment en inhibant *Foxl2*. Ce rôle se fait de façon conjointe avec SOX9 puisque la double délétion, spécifique aux cellules de Sertoli, de *Dmrt1* et *Sox9* conduit à une augmentation du nombre de cellules exprimant FOXL2 dès 14 j*pp* (Minkina *et al*, 2014).

Ce rôle inhibiteur de DMRT1 sur l'expression de *Foxl2* a également pu être observé lorsque la surexpression ou l'expression ectopique de DMRT1 est induite dans des gonades XX.

La surexpression de DMRT1 a été permise dès 10.5 j*pc* grâce à l'utilisation d'un transgène avec un enhancer *Wt1* qui est exprimé dans toutes les cellules destinées à être des cellules supportrices. De cette façon, les gonades XX transgéniques étaient similaires à des testicules dès 14.5 j*pc* avec une très faible expression de *Foxl2* (Zhao *et al*, 2015).

L'expression ectopique dans les cellules de soutien femelle a aussi été induite grâce une Cre recombinase liée à *Sf1*. Ainsi, dans toutes les cellules issues des progéniteurs communs exprimant SF1, le *Dmrt1* endogène est remplacé par un *Dmrt1* couplé à la *Gfp*. De cette façon, les auteurs ont pu observer la présence de cellules exprimant DMRT1 à 13.5 j*pc* alors que SOX9 n'est observé qu'à partir de 10 j*pp*. A 8-10 semaines les gonades des souris transgéniques présentent peu de cellules exprimant FOXL2 alors que des cellules positives pour DMRT1 sont présentes à la périphérie des vestiges des follicules (Lindeman *et al*, 2015). Alors que la surexpression de DMRT1 conduit à une inversion sexuelle chez les souris XX, son expression ectopique entraine une transdifférenciation des cellules de la granulosa. Dans les deux cas, DMRT1 inhibe l'expression de FOXL2.

Finalement, de récents travaux ont permis de confirmer la collaboration entre DMRT1 et SOX9 dans les cellules de Sertoli en période post-natale. Les régions transcriptionnellement accessibles dans ces cellules sont en effet liées par DMRT1, SOX9 ou bien les deux. De plus, le motif de fixation pour SOX9 dans les cellules de Sertoli était similaire à celui de DMRT1 comme déjà décrit auparavant (Rahmoun *et al*, 2017). Par ailleurs, l'expression ectopique de *Dmrt1* dans des cellules de la granulosa en culture est capable d'induire l'expression de *Sox9* alors que celle de *Sox9* n'est pas capable d'induire *Dmrt1*. Enfin, DMRT1 et SOX9 sont capables de se lier de façon similaire à des régions d'ADN dans les cellules de Sertoli ou bien dans des gonades XX exprimant DMRT1 par transgénèse. Il s'avère aussi que, lorsque des cellules de la granulosa expriment DMRT1, SOX9 est capable de se fixer à plus de sites que dans celles exprimant uniquement SOX9. Ces données montrent donc que SOX9 et DMRT1 agissent de façon similaire au niveau de la chromatine et que la fixation de SOX9 semble dépendre de la présence de DMRT1. Les auteurs ont ainsi proposé deux explications à cela. Soit ces deux facteurs se lient de façon coopérative à certains éléments de réponse et la fixation de SOX9 nécessite donc que DMRT1 soit fixé à proximité. Soit, DMRT1 agit comme un facteur pionnier pour SOX9. En étant capable de reconnaitre des régions fermées de la chromatine et

<u>Tableau 1.</u> Principales cibles de DMRT1 dans le testicule de souris.
Ces cibles ont pu être identifiées par ChIP sur des testicules de souris âgées de 9 jours (Murphy *et al.*, 2010), 28 jours (Matson *et al.*, 2010 ; Matson *et al.*, 2011) ou 8 semaines (Zhang *et al.*, 2016). Les données récentes de Lindeman et collaborateurs ont été obtenues à partir de cellules de Sertoli isolées de testicules de 7 jours (Lindeman *et al.*, 2021).

Fonction biologique	**Gène cible de DMRT1**	**Référence(s)**
Modifications épigénétiques	*Hdac1*	Murphy *et al.*, 2010 Lindeman *et al.*, 2021
	Hdac4	Murphy *et al.*, 2010 Lindeman *et al.*, 2021
Auto-renouvellement, développement des spermatogonies	*Plzf*	Zhang *et al.*, 2016
	Sohlh1	Murphy *et al.*, 2010 Matson *et al.*, 2010
Contrôle de la pluripotence	*Sox2*	Krentz *et al.*, 2009
Contrôle de l'entrée en méiose	*Stra8*	Murphy *et al.*, 2010 Krentz *et al.*, 2011
Signalisation des androgènes	*Ar*	Murphy *et al.*, 2010 Lindeman *et al.*, 2021
Différenciation testiculaire	*Sox9*	Matson *et al.*, 2011 Lindeman *et al.*, 2021
	Sox8	Maston *et al.*, 2011
Différenciation ovarienne	*Foxl2*	Matson *et al.*, 2011
	Esr1	Matson *et al.*, 2011
	Esr2	Matson *et al.*, 2011 Lindeman *et al.*, 2021
	Wnt4	Matson *et al.*, 2011 Lindeman *et al.*, 2021
	Rspo1	Matson *et al.*, 2011
	Axin 2	Murphy *et al.*, 2010 Lindeman *et al.*, 2021
	Ctnnb1	Lindeman *et al.*, 2021

donc non accessibles par SOX9, puis en recrutant des facteurs remodelant, DMRT1 favoriserait ainsi la fixation de SOX9 sur ces cibles (Lindeman *et al*, 2021) **(Figure 29)**.

En plus de son rôle inhibiteur sur FOXL2, DMRT1 semble également avoir une implication dans les fonctions de SOX9 au niveau des gonades durant les stades post-nataux.

c. Cibles de DMRT1 dans le testicule de souris

Au niveau transcriptionnel, il a pu être montré que la délétion de *Dmrt1* dans les cellules de Sertoli avait un impact sur l'expression d'un plus grand nombre de gènes que lors d'une délétion dans les cellules germinales. La comparaison de ces données avec des données de ChIP-seq a permis de voir comment se comportaient les cibles de DMRT1 lorsque son expression était abolie. Ainsi, dans les cellules de Sertoli, la perte de *Dmrt1* conduit principalement à la diminution de l'expression de ses gènes cibles suggérant qu'il a plutôt un rôle d'activateur transcriptionnel dans ce type cellulaire. De façon intéressante, plusieurs gènes présentent une régulation opposée lorsque *Dmrt1* est supprimé dans l'un ou l'autre des types cellulaires. Cela suggère donc qu'il est non seulement capable d'activer ou de réprimer la transcription de gènes dans les deux types cellulaires mais qu'il peut aussi affecter la transcription d'un même gène de façon différente d'un type cellulaire à l'autre. De plus, les changements d'expression génique dépendants de DMRT1 sont étroitement associés à des changements de marques épigénétiques au niveau de la chromatine (Murphy *et al*, 2010). Deux enzymes impliquées dans la désacétylation des histones, *Hdac1* (Histone Deacetylase 1) et *Hdac4* (Histone Deacetylase 4) sont en effet des cibles de DMRT1 (Murphy *et al*, 2010; Lindeman *et al*, 2021) **(Tableau 1)**.

Cet impact plus important de DMRT1 dans les cellules de Sertoli peut s'expliquer par le fait que dans ce type cellulaire, il est crucial tout au long de la vie pour le maintien de leur identité alors que dans les cellules germinales, son expression est limitée aux spermatogonies. D'ailleurs, en plus de contrôler leur auto-renouvellement *via* la régulation directe de *Plzf* (Zhang *et al*, 2016), DMRT1 contrôle aussi indirectement leur différenciation en se fixant sur *Sohlh1* (Spermatogenesis And Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 1) (Matson *et al*, 2010; Murphy *et al*, 2010). Ce gène est en effet essentiel à la prolifération et la différenciation des spermatogonies, sa délétion entrainant leur développement prématuré en spermatocytes (Ballow *et al*, 2006). Parmi les autres cibles des cellules germinales, nous retrouvons *Sox2* (Sex determining region Y-box 2) (Krentz *et al*, 2009), impliqué dans le contrôle de la pluripotence (Zhang & Cui, 2014) et *Stra8* (Murphy *et al*, 2010; Krentz *et al*, 2011) **(Tableau 1)**.

Le rôle de DMRT1 dans la polarisation des cellules de Sertoli passe aussi indirectement par un effet sur leur maturation. DMRT1 se fixe en effet sur le récepteur aux androgènes (*Ar*) (Murphy *et al*, 2010; Lindeman *et al*, 2021) **(Tableau 1)** dont l'expression est observée dans les cellules de Sertoli juste avant leur maturation (Bremner *et al*, 1994; Kim *et al*, 2007). Par ailleurs, l'implication de DMRT1 dans le maintien de l'identité des cellules de Sertoli, conjointement avec SOX9 passe par une fixation en amont de *Sox9* (TESCO et Enh32) et aussi sur un autre gène Sox, *Sox8* (Matson *et al*, 2011; Lindeman *et al*, 2021) **(Tableau 1)**.

Finalement, nous avons vu précédemment que DMRT1 exerçait un rôle inhibiteur sur FOXL2. L'étude de ses cibles par ChIP suggère qu'il est en réalité capable d'inhiber la différenciation ovarienne en se fixant sur de nombreux gènes impliqués dans ce processus. En plus de *Foxl2*, DMRT1 a en effet pour cibles les récepteurs aux œstrogènes (*Esr1* et *Esr2* (Estrogen Receptor 2)) et de nombreux acteurs de la voie RSPO1/WNT4/β-caténine (*Wnt4*, *Rspo1*, *Axin2*, *Ctnnb1*) (Murphy *et al*, 2010; Matson *et al*, 2011; Lindeman *et al*, 2021) **(Tableau 1).**

d. Importance du fond génétique

De façon surprenante, il a en effet pu être observé que la suppression totale de *Dmrt1* conduisait à des phénotypes différents en fonction du fond génétique des souris. Alors que les souris C57BL6/J (B6) ont une dysgénésie testiculaire en période post-natale, les souris 129Sv développent des tératomes. Des groupes de cellules de carcinomes embryonnaires sont ainsi observés dès la naissance puis deviennent des tératomes trois semaines après. Ceci est spécifique aux mâles puisque des tumeurs ovariennes ne sont pas observées chez les souris mutantes femelles. Cette formation de tératomes est dépendante des cellules germinales puisque la perte de *Dmrt1* dans les cellules de Sertoli ne permet pas leur développement alors que la perte dans les cellules germinales est suffisante (Krentz *et al*, 2009). L'analyse transcriptomique de ces souris a permis la mise en évidence d'un rôle supplémentaire de DMRT1. Alors que les phénotypes ne sont observés qu'après la naissance, 490 gènes voient leur expression modifiée dès 15.5 j*pc* chez les B6 contre 632 chez les 129Sv. Ces gènes dérégulés présentent une expression principalement diminuée chez les B6 alors qu'elle est plutôt augmentée chez les 129Sv. Chez cette souche, la perte de *Dmrt1* conduit donc majoritairement à une augmentation de l'expression génique. D'un point de vue fonctionnel, les gènes dérégulés ne sont pas tout à fait associés aux mêmes fonctions selon le fond génétique. Chez les souris B6, ce sont plutôt des gènes associés à la gonadogenèse et à la spermatogenèse. Chez les souris 129Sv, la

perturbation concerne des gènes associés à des fonctions plus générales avec notamment la morphologie ou l'homéostasie cellulaire. Les deux souches présentent quand même une perturbation commune au niveau de la régulation des gènes associés à la pluripotence. Mais une nouvelle fois, plus de gènes sont affectés chez les mutants 129Sv chez qui la perte de *Dmrt1* conduit à un défaut d'inhibition des gènes de pluripotence, cela pouvant expliquer la formation des tératomes spécifiquement dans cette lignée (Krentz *et al*, 2013).

2. *Implication dans le développement ovarien*

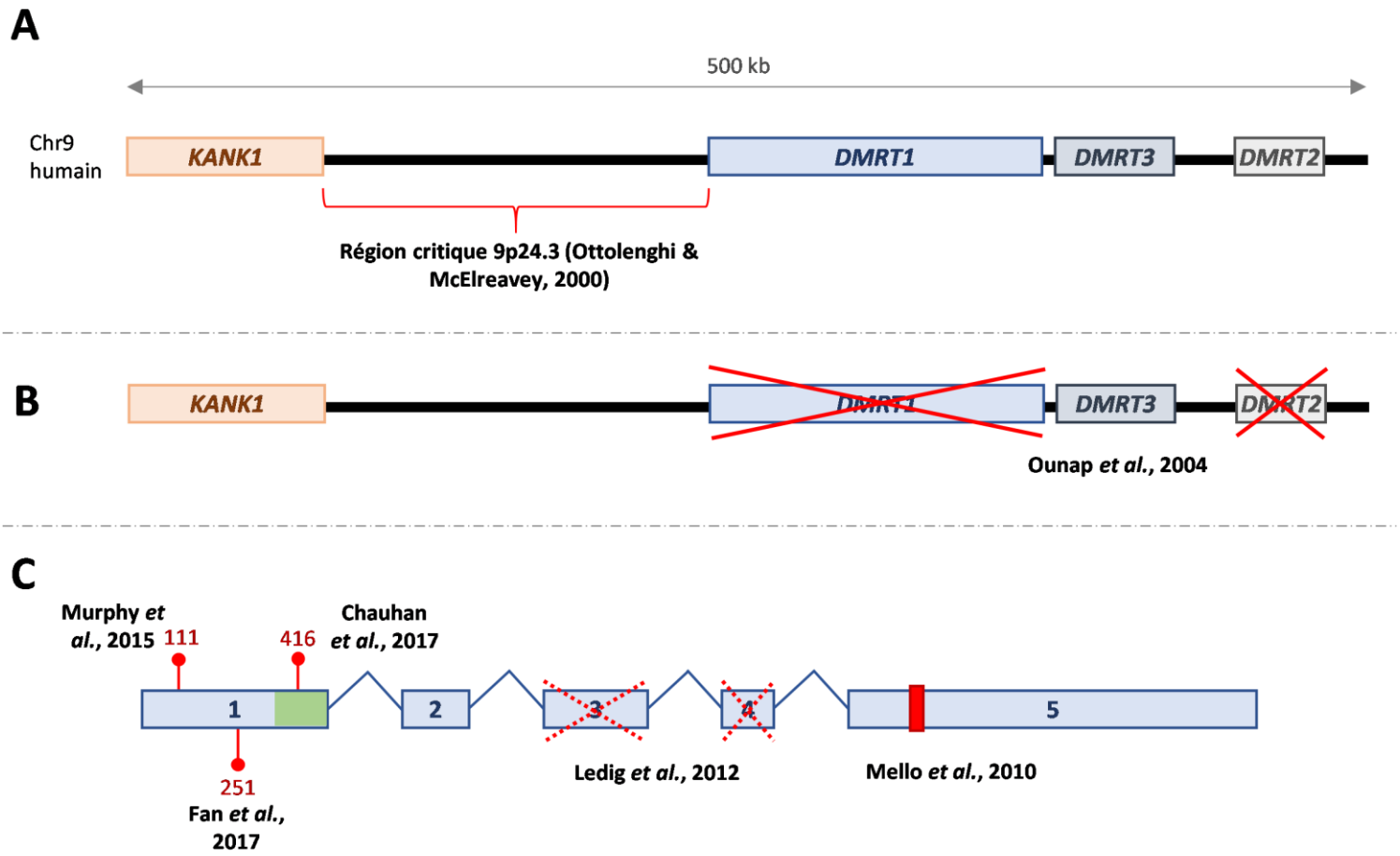
Comme décrit dans le **paragraphe B)1.**, chez la souris, DMRT1 est retrouvé dans les ovogonies puis disparait. L'analyse de gonades XX déficientes pour *Dmrt1* montre une forte réduction du nombre de cellules germinales exprimant STRA8 entre 13.5 et 15.5 j*pc*. Comme chez le mâle en période post-natale (Matson *et al*, 2010), des expériences de ChIP ont pu montrer la fixation de DMRT1 au niveau du promoteur de *Stra8* dans l'ovaire fœtal. Alors que dans les spermatogonies, DMRT1 inhibe la transcription de *Stra8*, il apparait que dans l'ovaire fœtal, il agit plutôt en tant qu'activateur de son expression. Malgré cette diminution de l'expression de *Stra8* et du nombre de follicules, les souris XX *Dmrt1*$^{-/-}$ ont une fertilité normale (Krentz *et al*, 2011). DMRT1 n'est donc pas crucial à la fertilité des souris femelles.

Après avoir détaillé les rôles de DMRT1 chez la souris, voyons maintenant les conséquences des différentes mutations impliquant *DMRT1* chez l'humain.

E) Mutations affectant *DMRT1* chez l'Homme

1. *Mutations et désordres du développement sexuel*

Plusieurs mutations conduisent à des délétions de régions assez larges comportant d'autres gènes que *DMRT1* et ne permettent pas d'établir formellement l'implication de celui-ci dans les phénotypes associés. Ainsi, en 1997, des mutations impactant le locus 9p ont été décrites chez deux patients. Le premier était né avec des organes génitaux externes féminins, des gonades impalpables et présentait un vagin et un hémi-utérus. Le second avait quant à lui des organes génitaux externes ambigus et l'histologie de ses gonades montrait une dysgénésie gonadique partielle. L'analyse du caryotype de ces deux patients a mis en évidence qu'ils étaient 46, XY suggérant pour la première fois que le locus 9p était nécessaire au



<u>Figure 30.</u> Position de différentes mutations impactant *DMRT1* identifiées chez l'humain et associées à des 46, XY DSD avec dysgénésie gonadique.
(**A**) Représentation de la région critique du locus 9p identifiée entre l'extrémité 3' du gène *KANK1* et l'extrémité 5' de *DMRT1* (Ottolenghi *et al.*, 2000). (**B**) Alors que les mutations décrites auparavant concernaient de larges délétions du locus 9p, celle décrite par Ounap en 2004 impactait uniquement *DMRT1* et *DMRT3* (Ounap *et al.*, 2004). (**C**) Représentation du transcrit de *DMRT1* composé de 5 exons avec le domaine DM dans le premier exon (rectangle vert) et la position des mutations impactant les exons 3 et 4 (Ledig *et al.*, 2012) ou l'exon 5 (Mello *et al.*, 2010) ainsi que des mutations ponctuelles identifiées dans l'exon 1 (Murphy *et al.*, 2015 ; Chauhan *et al.*, 2017 ; Fan *et al.*, 2017).

développement testiculaire (Veitia *et al*, 1997). Une autre étude a ensuite combiné plusieurs données afin de définir que la région 9p24.3 correspondait à la région critique. L'haploinsuffisance de cette région était en effet à la base de 46, XY DSD avec dysgénésie gonadique associés au locus 9p. La frontière de cette région minimale se retrouve entre l'extrémité 3' du gène *KANK1* (KN motif and ankyrin repeat domains 1) et l'extrémité 5' de *DMRT1* (Ottolenghi & McElreavey, 2000) **(Figure 30A)**. En 2002, de larges délétions ont été identifiées au niveau du locus 9p chez deux fœtus : un 46, XY et un 46, XX. Chez le premier, des organes ambigus ont pu être observés à l'échographie. Ses gonades présentaient une dysgénésie partielle avec une large proportion de tissus testiculaires où des spermatogonies étaient rarement observées. L'analyse de la séquence de *DMRT1* n'a en revanche pas permis l'identification de mutation dans les régions codantes. Le second fœtus présentait quant à lui un développement femelle normal malgré la délétion du bras court du chromosome 9 (Vialard *et al*, 2002). Ces phénotypes ont permis aux auteurs de conclure que chez les garçons, l'haploinsuffisance du locus 9p conduisait à un phénotype proche de celui décrit chez la souris *Dmrt1* KO par Raymond et collaborateurs en 2000 (Raymond *et al*, 2000). De la même façon chez les fœtus filles, cette haploinsuffisance ne semble pas impacter le développement ovarien, au moins jusqu'au stade où il a été observé.

Par la suite, d'autres études de cas de DSD ont apporté plus d'éléments en faveur d'une implication de DMRT1 dans la différenciation testiculaire chez l'homme. En 2004, trois patients chez qui la perte de *DMRT1* et *DMRT2* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 2) a pu être prédite **(Figure 30B)**, ont été étudiés. Le premier, avec un caryotype 46, XY (monosomie du locus 9p), présentait des organes sexuels féminisés mais ses gonades étaient dysgénésiques et correspondaient à des ovotestis. Les deux autres patients étaient 46, XX et ne présentaient pas d'impact sur le développement ovarien (Ounap *et al*, 2004). Cela confirmait que DMRT1 pouvait être nécessaire au développement testiculaire normal. Deux autres études différentes présentaient des patients avec une ambiguïté sexuelle. Mello et collaborateurs ont ainsi mis en évidence la présence d'une insertion après le codon stop de *DMRT1* **(Figure 30C)** chez un enfant 46, XY avec une dysgénésie gonadique partielle. Cet enfant avait des testicules prépubères bilatéraux avec une hypoplasie tubulaire, une sévère hypoplasie des cellules germinales et une hyperplasie des cellules de Sertoli (Mello *et al*, 2010). Une nouvelle fois, ce phénotype n'est pas sans rappeler ce qui a pu être observé chez la souris (Raymond *et al*, 2000; Fahrioglu *et al*, 2007). Dans la deuxième étude, le cas étudié présentait un phénotype plus sévère. Ce nourrisson 46, XY présentait en effet une gonade gauche avec de petits follicules et quelques cellules germinales alors qu'à l'échographie, la gonade droite semblait être composée

de tissu testiculaire. La délétion de la région 9p24.3 identifiée affectait 35 kb et conduisait surtout à une délétion partielle des exons 3 et 4 de *DMRT1* (Ledig *et al*, 2012) **(Figure 30C)**. Cette mutation a été la première décrite impactant une partie de la région codante de *DMRT1* et associée à un développement ovarien partiel.

Quelques années plus tard, des travaux du laboratoire de David Zarkower ont permis la description de la première mutation ponctuelle au sein de *DMRT1*. Dans un premier temps, ces travaux ont montré que DMRT1 pouvait se lier à l'ADN en tétramère, trimère ou dimère et que des mutations dans le domaine DM pouvaient affecter cette fixation à l'ADN. Les auteurs décrivent ensuite un patient 46, XY né complétement féminisé et présentant une dysgénésie gonadique complète. Une mutation ponctuelle, *de novo* hétérozygote (R111G) **(Figure 30C)** au sein de l'hélice de reconnaissance de DMRT1 a pu être identifiée chez ce patient qui ne présentait pas d'autre mutation pathogène. Par ailleurs, cette mutation n'était pas retrouvée chez des individus contrôles. L'analyse de la protéine mutée a mis en évidence une forte réduction de son affinité à l'ADN et surtout une faible fixation au niveau des sites SOX9. Le phénotype sévère associé à cette mutation peut ainsi s'expliquer par une perte de fonction de la protéine ou bien par une perturbation de la stœchiométrie de celle-ci nécessaire à une liaison normale sur certains sites de fixation de DMRT1 (Murphy *et al*, 2015). Récemment, les auteurs ont pu modéliser cette mutation dans le modèle souris. Ainsi, les souris avec la mutation R111G se développent comme des mâles mais ont des testicules hypoplasiques et sont infertiles. Alors qu'ils présentent une morphologie testiculaire normale jusqu'à 10 j*pp*, la perte des cellules germinales est observée à partir de 23 j*pp*. Cela s'explique notamment par des défauts identifiés au niveau de la barrière hémato-testiculaire. Les auteurs ont ensuite comparé le transcriptome de ces souris (*Dmrt1*^{R111G}) à celui des souris totalement déficientes pour Dmrt1 (*Dmrt1*$^{-/-}$). De façon intéressante, les *Dmrt1*^{R111G} se retrouvent à l'intermédiaire entre les XY contrôles d'un côté et les XX contrôles ainsi que les XY *Dmrt1*$^{-/-}$ de l'autre. Bien que la mutation R111G ne modifie pas l'expression de SOX9 et n'induit pas non plus une forte expression de FOXL2, elle conduit tout de même à une féminisation partielle du transcriptome de ces souris. Finalement, la réalisation de ChIP-seq sur des gonades *Dmrt1*^{R111G} en comparaison à des testicules hétérozygotes pour Dmrt1 (*Dmrt1*$^{+/-}$) a confirmé que la mutation pouvait modifier la spécificité de liaison à l'ADN de DMRT1. En effet, les gonades *Dmrt1*^{R111G} ont un grand nombre de pics/cibles avec une fixation qui est augmentée ou même qui n'est pas retrouvée chez les *Dmrt1*$^{+/-}$ (Murphy *et al*, 2022). Cette nouvelle mutation ponctuelle dans DMRT1 conduit donc à une liaison inappropriée au niveau de l'ADN conduisant à sa fixation sur de nouvelles cibles.

D'autres mutations ponctuelles au sein de *DMRT1* ont pu être identifiées mais n'ont pas été autant caractérisées que la R111G.

Une première étude a mis en évidence une mutation hétérozygote faux-sens chez un individu 46, XY avec une dysgénésie gonadique complète. Cette inversion d'un T en A en position 416 de la séquence de *DMRT1* **(Figure 30C)** était absente des bases de données contrôles et non retrouvées chez 50 patients sains (Chauhan *et al*, 2017).

La même année, c'est un changement d'un A en G en position 251 (mutation faux sens) **(Figure 30C)** qui était retrouvée chez un patient 46, XY présentant aussi une dysgénésie gonadique complète. Les auteurs ont pu identifier que cette mutation avait été transmise par la mère qui ne présentait aucun phénotype. Cela suggérait une nouvelle fois l'absence d'effet de mutations dans *DMRT1* chez les femmes XX (Fan *et al*, 2017).

Finalement, en 2019, une large cohorte de 52 patients avec des DSD 46, XY a été étudiée. Parmi les 27 patients avec une dysgénésie gonadique complète, un variant hétérozygote dans le premier doigt de zinc de *DMRT1* a été identifié chez un patient. Cette mutation peut impacter l'interaction entre DMRT1 et le petit sillon de l'ADN (Buonocore *et al*, 2019).

Différentes mutations au sein du gène ou pouvant impliquer DMRT1 ont été décrites comme étant associées à des DSD. Les patients 46, XY ont des phénotypes variés allant d'une dysgénésie testiculaire à un développement ovarien. Les patients 46, XX ne semblent pas présenter de phénotype.

Chez les hommes, des mutations en lien à des cas d'infertilité masculine ont également pu être recensées.

2. Mutations et infertilité masculine

L'analyse de données génomiques (SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) et CNV (Copy Number Variant)) issues de 323 cas d'infertilité masculine a permis d'identifier 5 délétions au sein de la région codante de *DMRT1*. Ces délétions d'un fragment de taille comprise entre 54 kb et 2 Mb ont été retrouvées chez des patients avec une azoospermie. Parmi ces hommes, des biopsies testiculaires ont été réalisées chez deux d'entre eux mettant en évidence un syndrome de « Sertoli-cells only » chez l'un et un arrêt au stade spermatocyte chez l'autre (Lopes *et al*, 2013).

De la même façon, l'analyse d'une cohorte de patients avec une azoospermie non obstructive a permis l'identification de 3 variants : un dans la région promotrice, un dans le premier intron et un dans le troisième intron (Lima *et al*, 2015).

Ces données suggèrent que *DMRT1* est également associé à la fertilité masculine. Cela n'est pas très surprenant à la vue de son expression à la fois somatique et germinale aussi chez l'homme. Ceci est également cohérent avec les fonctions de DMRT1 dans les cellules germinales décrites chez la souris.

Par ailleurs, le fait que des mutations dans *DMRT1* puissent aussi bien impacter la différenciation testiculaire que la spermatogenèse peut s'expliquer par une régulation altérée de ses gènes cibles en fonction de la mutation. Alors que les protéines sauvages inhibent l'activité du promoteur de *CYP19A1* et activent celui de *STRA8*, différents variants associés à des cas d'infertilité ou de dysgénésie gonadique régulent différemment l'activité du promoteur de *CYP19A1* ou de *STRA8* (Emich *et al*, 2023).

De récents travaux ont également mis en évidence l'importance de DMRT1 dans le « licensing » des CGP mâles chez l'humain. L'expression de DAZL fait suite à l'augmentation progressive de l'expression de DMRT1 au fur et à mesure du développement des cellules germinales. L'implication de DMRT1 a été confirmée par l'identification, par Cut and Run, d'une fixation au niveau de *DAZL*. La fixation de DMRT1 au niveau des gènes impliqués dans l'arrêt mitotique a également pu être mise en évidence (Irie *et al*, 2023). Alors que chez la souris, DMRT1 a été décrit comme étant impliqué dans la survie des cellules germinales, l'auto-renouvellement des spermatogonies et la transition mitose/méiose, chez l'humain, il semblerait qu'il soit impliqué dès l'engagement des CGP vers la voie de différenciation mâle.

3. Mutations et infertilité féminine

A ce jour, il semble qu'une seule mutation impactant *DMRT1* ait été décrite comme associée à une infertilité féminine. Celle-ci a été retrouvée chez une femme de 31 ans, infertile et présentant de petits ovaires à l'échographie. Ses analyses hormonales ont mis en évidence un hypogonadisme hypergonadotrope, une absence de maturation folliculaire et une faible réserve ovarienne. Les analyses cytogénétiques ont permis d'identifier une délétion terminale d'environ 7.6 kb au niveau du locus 9p, comportant *DMRT1*, *DMRT2* et *DMRT3* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 3). Cette étude était donc la première à associer le locus 9p avec un cas d'insuffisance ovarienne prématurée (Bartels *et al*, 2013).

En plus d'être un candidat pour les phénotypes de 46, XY DSD avec dysgénésie gonadique complète, *DMRT1* s'avère aussi être un nouveau candidat dans les cas d'infertilité masculine mais aussi féminine. Du fait que les mutations peuvent aussi toucher d'autres gènes *DMRT*, voyons à présent ce qui est connu sur ces gènes.

F) Et les autres gènes *DMRT* ?

Comme indiqué dans la **partie A)**, il existe huit gènes *DMRT* décrits chez les mammifères. L'expression de sept de ces gènes a pu être étudiée chez la souris et l'humain.

1. Expression des gènes de la famille DMRT dans les gonades

Chez la souris, ces gènes sont exprimés dans une variété de tissus tels que le cerveau, l'estomac, les poumons ou encore les reins et les gonades. L'analyse de l'expression gonadique entre 11.5 et 15.5 j*pc* a permis de déterminer s'il y avait une expression spécifique du sexe. Ainsi, *Dmrt3* et *Dmrt4* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 4) sont exprimés de façon similaire dans les testicules et les ovaires à 11.5 j*pc*. Après 13.5 j*pc*, *Dmrt3* sera exprimé uniquement dans les testicules. *Dmrt5* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 5) et *Dmrt7* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 7) sont quant à eux plutôt exprimés dans les ovaires au cours du développement mais sont aussi fortement exprimés dans les testicules adultes. Aux stades étudiés en période fœtale, *Dmrt6* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 6) est peu exprimé dans les tissus testés mais il apparait être bien exprimé dans les testicules adultes (Kim *et al*, 2003).

Chez l'humain, seule l'expression gonadique a pu être étudiée. *DMRTA1* (*DMRT4*) et *DMRTC1* (*DMRT8*) sont exprimés dans les deux sexes alors que *DMRT2*, *DMRT3*, *DMRTA2* (*DMRT5*), *DMRTB1* (*DMRT6*) et *DMRTC2* (*DMRT7*) sont exprimés uniquement dans l'ovaire. L'expression de *DMRT2* diminue une fois que la méiose est initiée alors que les autres gènes exprimés dans l'ovaire augmentent après cette initiation (Poulain *et al*, 2014). Cette étude souligne par ailleurs l'implication de *DMRTA2* (*DMRT5*) dans la différenciation des cellules germinales femelles. Grâce à un modèle de xénogreffe ovarienne, les auteurs montrent que l'inhibition de l'expression de *DMRTA2* (*DMRT5*) induite par l'utilisation de siRNA conduit à des gonades plus petites. Dans celles-ci, l'expression de NANOG est inchangée alors que celle de marqueurs de cellules germinales plus différenciées est diminuée. De plus, les cellules qui restent pluripotentes sont plus nombreuses au détriment de celles qui initient la méiose. Dans

les ovaires humains, *DMRTA2* (*DMRT5*) semble donc promouvoir la différenciation des cellules germinales juste avant leur entrée en méiose (Poulain *et al*, 2014).

2. *Rôles des DMRT*

L'analyse plus approfondie de chacun des gènes a donné quelques indications sur leur rôle en fonction des espèces.

DMRT2 est ainsi préférentiellement exprimé dans le rein, le musque squelettique et le thymus chez l'humain (Ottolenghi *et al*, 2000). Chez la souris et le poisson zèbre, il est exprimé dans les somites (Seo *et al*, 2006; Lourenço *et al*, 2010). Les souris déficientes pour ce gène ont des anomalies squelettiques conduisant à une létalité à la naissance mais n'ont pas de phénotype gonadique en période fœtale (Seo *et al*, 2006).

Dmrt3 est principalement exprimé dans le cerveau chez la souris et le poulet. Il est aussi retrouvé dans les somites et les canaux de Müller mais est absent des gonades chez le poulet (Smith *et al*, 2002). Du fait de sa position à proximité de *DMRT1*, certaines mutations décrites chez l'humain touchant le locus 9p impactaient aussi *DMRT3*. Afin d'étudier son rôle, un modèle de souris déficientes a été généré. Bien que ces souris présentent des malocclusions dentaires sévères au vieillissement, la perte de *Dmrt3* est sans effet sur le développement testiculaire ainsi que sur la spermatogenèse. De plus, la double délétion de *Dmrt1* et *Dmrt3* n'entraine pas d'effets supplémentaires à ceux observés chez les souris *Dmrt1*$^{-/-}$ (Inui *et al*, 2017). Par ailleurs, chez l'humain, le séquençage d'exome d'individus présentant des DSD a mis en évidence la présence de variants hétérozygotes dans les gènes *DMRT3* et *OAS3* (2'-5'-OligoAdenylate Synthetase 3) chez les patients XY avec dysgénésie gonadique totale ou hypospadias. L'analyse *in vitro* des effets de la protéine DMRT3 mutée montre qu'elle est capable d'induire une forte activité du promoteur de *ESR1*. En conditions normales, OAS3 interagit avec DMRT3 pour former un complexe avec une RNase qui dégradera l'ARNm de *ESR1*. En présence de la protéine mutante, ce complexe se forme mal, conduisant à une moindre réduction de *ESR1* pouvant être à l'origine de la féminisation des individus 46, XY (Tsai *et al*, 2020). Un rôle de DMRT3 a également été décrit chez le cheval. Une mutation induisant un codon stop prématuré est ainsi associée à un défaut de locomotion. L'analyse de souris déficientes pour *Dmrt3* a permis de clarifier cette implication. De par son expression dans des neurones de la moelle épinière, DMRT3 est essentiel au développement d'un réseau assurant le contrôle des mouvements des membres (Andersson *et al*, 2012).

A l'âge adulte, chez la souris, *Dmrt4* est exprimé dans les gonades mais aussi le foie, le cœur, l'épididyme ou encore les glandes salivaires. L'analyse de souris déficientes pour ce gène ne montre pas de problème de fertilité. Des follicules poly-ovulatoires sont néanmoins observés dans les gonades des souris XX *Dmrt4*$^{-/-}$ mais aussi chez les XX *Dmrt4*$^{+/-}$ (Balciuniene *et al*, 2006). DMRT4 pourrait donc avoir un rôle au cours de la folliculogenèse au moment de la fracture des nids ovigères et de la formation des follicules primordiaux.

Dmrt5 est principalement retrouvé dans le cerveau où il est requis pour le développement du cortex cérébral (Saulnier *et al*, 2013).

Enfin, DMRT6 et DMRT7 sont détectés dans les testicules adultes et ils ont un rôle au cours de la spermatogenèse. DMRT6 est exprimé dans certaines spermatogonies différenciées mais n'est pas présent dans les cellules de Sertoli ni dans les cellules germinales méiotiques. Les mâles déficients pour *Dmrt6* ont des testicules plus petits et des défauts sévères de spermatogenèse. Les spermatogonies indifférenciées ne sont pas impactées par cette perte alors que celles en différenciation ont une expression altérée de SOHLH1, crucial à leur développement. Par ailleurs le nombre de cellules positives pour STRA8 est fortement diminué. DMRT6 semble donc être impliqué dans la transition mitose/méiose en inhibant les gènes de la différenciation spermatogoniale et en permettant l'activation de gènes nécessaires à la méiose (Zhang *et al*, 2014). DMRT7 est quant à lui préférentiellement exprimé dans les spermatocytes au stade pachytène où il est retrouvé au niveau de la vésicule sexuelle (ou « XY body »), un domaine de chromatine dense renfermant les chromosomes sexuels. L'analyse de souris déficientes pour *Dmrt7* montre que les mâles sont totalement infertiles. Alors que leurs testicules apparaissent normaux jusqu'à 14 j*pp*, les cellules germinales seront ensuite bloquées au stade pachytène. Chez les souris XY *Dmrt7*$^{-/-}$, la formation du « XY body » est normale mais les modifications épigénétiques nécessaires à la transition vers le stade diplotène ne se font pas. DMRT7 est donc essentiel à la bonne progression des spermatocytes en prophase méiotique (Kim *et al*, 2007).

CHAPITRE V

Objectifs de la thèse

Le laboratoire au sein duquel j'ai effectué ma thèse s'intéresse aux processus de la détermination du sexe et de différenciation gonadique chez différentes espèces et notamment chez la chèvre. Des travaux chez cette espèce ont soulignés que l'expression de DMRT1 est observée avant celle de SOX9 dans des gonades XX dépourvues de *FOXL2* qui se développent en testicules (Elzaiat *et al*, 2014). Cette étude a conduit à notre hypothèse principale selon laquelle DMRT1 pourrait activer l'expression de *SOX9* et permettre la différenciation testiculaire.

Les mutations retrouvées chez l'humain (Murphy *et al*, 2015; Chauhan *et al*, 2017; Fan *et al*, 2017; Buonocore *et al*, 2019) associées à des phénotype de 46, XY DSD avec dysgénésie gonadique suggéraient elles aussi une implication de DMRT1 dans la détermination testiculaire. D'autant plus que chez de nombreuses espèces, il est décrit comme étant le facteur déterminant du testicule (Matsuda *et al*, 2002; Yoshimoto *et al*, 2008; Dai *et al*, 2021; Ioannidis *et al*, 2021). Il était ainsi nécessaire d'analyser l'effet de la délétion de *DMRT1* chez une espèce de mammifères non rongeurs.

Le modèle caprin présentant des limites, notamment dans les délais d'obtention de fœtus mutants pour un gène d'intérêt, il fallait utiliser une espèce présentant une durée de gestation plus courte et un nombre de petits par portées plus important. C'est ainsi qu'il a été décidé d'adresser certaines questions sur le modèle lapin, déjà utilisé au sein de l'unité BDR (aujourd'hui unité BREED) comme modèle du développement placentaire humain et où les techniques de transgénèse étaient développées depuis les années 1990. Chez cette espèce, la gestation dure 31 jours et peut donner jusqu'à 12 petits (6 à 8 en moyenne) contre 1 à 2 petits obtenus chez la chèvre après 150 jours de gestation.

Suite à la génération de lapins mutants pour le gène codant l'aromatase (*CYP19A1*) grâce à l'utilisation d'une TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) spécifique (Jolivet *et al*, 2022), la même méthodologie a initialement été utilisée pour invalider le gène *DMRT1*. Chez le lapin, il est localisé sur le chromosome 1 et est composé de 5 exons. La protéine traduite fait 369 acides aminés **(Figure 22)** avec un domaine DM codé conjointement par les exons 1 et 2. Après des essais infructueux en TALEN, c'est finalement le système CRISPR/Cas9 qui, en ciblant le troisième exon, a permis la création d'une lignée de lapins

mutants pour *DMRT1* en 2015. La collecte d'échantillons et l'initiation de la caractérisation des phénotypes ont ainsi pu être initiées avant mon arrivée au laboratoire.

Comme attendu selon notre hypothèse, les fœtus XY *DMRT1*$^{-/-}$ différencient des ovaires et présentent donc une inversion sexuelle. Chez les fœtus XX, l'abolition de la présence de DMRT1 n'impacte pas le développement ovarien précoce. Néanmoins, il a pu être observé que les cellules germinales, qu'elles soient dans des ovaires XX *DMRT1*$^{-/-}$ ou bien des gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ sexuellement inversées, ont un défaut méiotique sévère et précoce, conduisant à la stérilité totale de ces lapins avec une absence de cellules germinales à la puberté (vers 5 mois). De façon inattendue, un phénotype a également été observé à l'âge adulte chez les lapins XY *DMRT1*$^{+/-}$. Utilisés pour le renouvellement de la lignée et la production d'animaux homozygotes, les lapins hétérozygotes vieillissants finissaient par ne plus déclencher de gestation après des saillies observées de plusieurs femelles. L'analyse de leurs gonades a ainsi mis en évidence le développement d'une infertilité secondaire vers l'âge de deux ans, soit 18 mois après leur puberté.

Ma thèse visait donc à caractériser l'implication de *DMRT1* au cours de la différenciation gonadique mais aussi dans la fertilité chez les lapins adultes. Pour cela, j'avais trois grands objectifs :

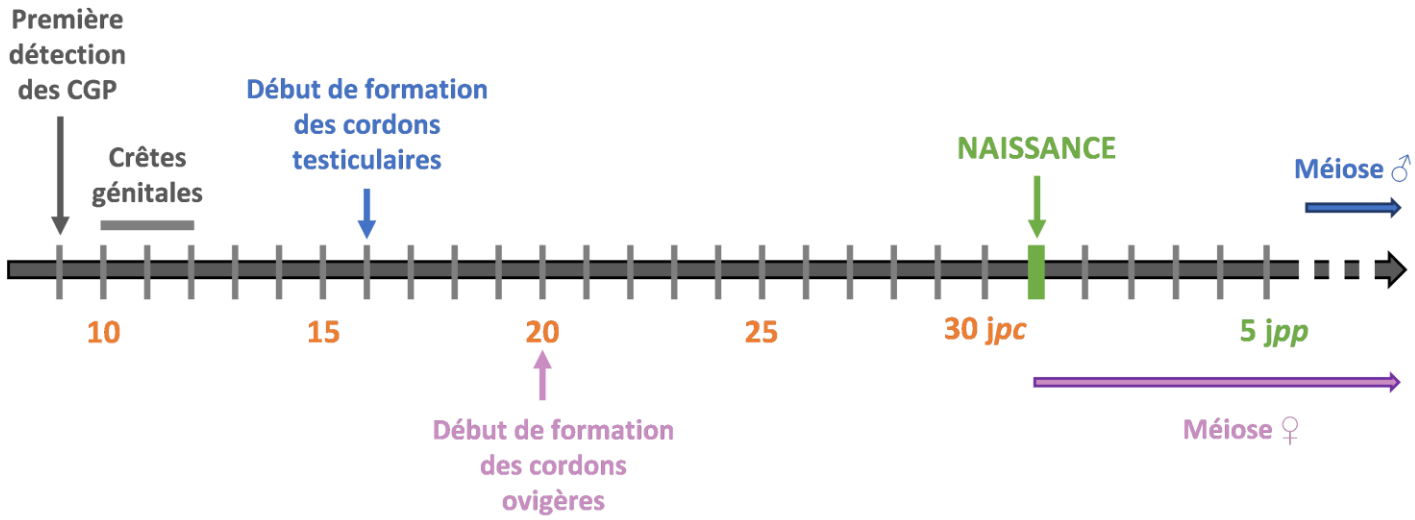
- **Caractériser la place de DMRT1 dans la cascade génétique gouvernant la différenciation testiculaire**. Pour cela, il fallait étudier la différenciation gonadique chez des lapins contrôles puis chez les homozygotes pour la mutation. La combinaison de colorations HES (Hematoxylin-Eosin-Safran), d'hybridation *in situ* (HIS) ainsi que d'immunohistochimies/immunofluorescences (IHC/IF) a permis cette analyse phénotypique. D'un point de vue moléculaire, des RT-qPCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) et une analyse transcriptomique par RNA-sequencing ont été réalisées en parallèle. Cela a permis l'amélioration des connaissances sur le développement gonadique chez le lapin mais surtout la mise en évidence du rôle primordial de *DMRT1* dans la détermination testiculaire. Ces résultats sont présentés dans **l'Article 1 : *DMRT1 is a testis determining gene in rabbits and is also essential for female fertility*** (Dujardin *et al.*, 2023).

- **Caractériser le rôle de DMRT1 dans la fertilité mâle**. La deuxième partie de ma thèse devait se concentrer sur l'étude des lapins hétérozygotes présentant une infertilité

secondaire. Le suivi de ces animaux aux cours de ma thèse a révélé une forte variabilité inter-individuelle. Certains lapins présentent en effet un phénotype sévère dès l'âge de 4 mois alors que d'autres étaient encore fertiles à l'âge de 3 ans. Le manque de connaissances sur la différenciation des cellules germinales mâles chez le lapin rendait une analyse complète difficile à tenir avant la fin de ma thèse. Cela a conduit à la proposition d'un sujet de stage de master 2 que j'ai co-encadré et ces études se poursuivent dans le cadre de la thèse d'Iris Barka. De plus, le blocage méiotique chez les femelles XX *DMRT1*$^{-/-}$ était aussi à étudier et est toujours en cours de caractérisation.

- **Déterminer les cibles de DMRT1 chez le lapin**. Finalement, au cours de ma thèse, je devais mettre au point la technique de ChIP à partir de gonades de lapins contrôles. Cela devait, dans un premier temps, me permettre d'étudier l'implication de DMRT1 dans la régulation de l'expression de *SOX9*. Les travaux de Nitzan Gonen (Gonen *et al*, 2018) montrant la forte conservation de sites de fixation de DMRT1 au sein l'enhancer 13, nous souhaitions analyser la fixation de DMRT1 au niveau de cette région. Dans un second temps, je devais étudier l'ensemble des cibles directes de DMRT1 en réalisant un ChIP-sequencing. Divers essais ont été réalisés mais je n'ai jamais réussi à obtenir des fragments de chromatine de tailles souhaitées. Il s'est aussi avéré que l'anticorps testé ne convenait pas totalement pour de l'immunoprécipitation de chromatine. Nous avons finalement fait appel à Francis Poulat (Institut de Génétique Humaine, Montpellier), spécialiste du ChIP sur gonades fœtales, pour le côté expérimental (réalisation du ChIP et génération des banques). Nous disposons désormais de données de ChIP-sequencing pour DMRT1 et SOX9 dans des testicules ainsi que pour DMRT1 et FOXL2 dans des ovaires, que j'ai pu analyser.

RÉSULTATS



<u>Figure 31.</u> Les principales étapes du développement gonadique chez le lapin.
Le lapin est une espèce avec une durée de gestation de 31 jours. Les premières CGP sont détectées à 9 j*pc*, juste avant la formation des crêtes génitales qui a lieu entre 10 et 12 j*pc*. Dans les gonades XY, les cordons testiculaires initient leur formation à 16 j*pc*, stade à partir duquel les gonades sont morphologiquement distinguables. Les cellules germinales mâles n'entreront en méiose qu'à partir de deux mois de vie post-natale. Dans les gonades XX, la formation des cordons ovigères commence à 20 j*pc*, avant l'entrée en méiose des cellules germinales qui se fera à la naissance.

Développement gonadique chez le lapin

Avant de vous présenter les résultats complémentaires à ceux publiés dans **l'Article 1**, je souhaitais vous donner des informations sur les grandes étapes du développement gonadique chez le lapin **(Figure 31)**.

Le lapin est une espèce à chromosomes sexuels XX/XY et chez qui le TDF est le gène SRY (Song *et al*, 2017). Les CGP sont observées dès 9 j*pc* dans l'endoderme de l'intestin postérieur (Chretien, 1966), soit durant le premier tiers de la gestation qui dure 31 jours **(Figure 31)**. A 12 j*pc*, certaines d'entre elles ont déjà colonisé les crêtes génitales (Chretien, 1966). Ces dernières deviennent évidentes à partir de 13 j*pc* et il devient possible de distinguer un testicule d'un ovaire à 15 j*pc* (Díaz-Hernández *et al*, 2008). Cela fait suite à l'expression de *SRY* qui atteint un pic entre 15 et 20 j*pc* (Díaz-Hernández *et al*, 2008; Daniel-Carlier *et al*, 2013). Chez le lapin, la détermination du sexe a donc lieu à la moitié de la gestation. Contrairement à la souris, l'expression de *SRY* est maintenue tout au long de la vie. Comme chez l'humain et la souris, *SOX9* est retrouvé dans les gonades des deux sexes avant la détermination sexuelle puis deviendra majoritaire dans les gonades XY (Daniel-Carlier *et al*, 2013). Cette expression de *SOX9* permettra l'initiation de la formation des cordons à 16 j*pc* (Wartenberg *et al*, 1991). Dans le testicule, la méiose des cellules germinales ne débutera qu'à deux mois de vie post-natale (Gondos *et al*, 1996) **(Figure 31)** et un animal est considéré comme sexuellement mature vers 5 mois (Daniel-Carlier *et al*, 2013).

Dans l'ovaire, *WNT4* et *RSPO1* sont exprimés précocement, avant *FOXL2* qui ne commence à être exprimé qu'à partir de 18 j*pc*. L'expression de *CYP19A1* atteint un pic à 20 j*pc* illustrant que la synthèse d'œstrogènes a lieu avant l'entrée en méiose des cellules germinales. Les premières figures de méiose ne sont en effet observées qu'à partir du premier jour de vie post-natale (Daniel-Carlier *et al*, 2013) **(Figure 31)**.

Article

DMRT1 is a testis determining gene in rabbits and is also essential for female fertility

Emilie Dujardin, Marjolaine André, Aurélie Dewaele, Béatrice Mandon-Pépin, Francis Poulat, Anne Frambourg, Dominique Thépot, Luc Jouneau, Geneviève Jolivet, Eric Pailhoux, Maëlle Pannetier

eLife 2023 12:RP89284

RESEARCH ARTICLE

DMRT1 is a testis-determining gene in rabbits and is also essential for female fertility

Emilie Dujardin[1,2]*, Marjolaine André[1,2†], Aurélie Dewaele[1,2†], Béatrice Mandon-Pépin[1,2], Francis Poulat[3], Anne Frambourg[1,2], Dominique Thépot[1,2], Luc Jouneau[1,2], Geneviève Jolivet[1,2], Eric Pailhoux[1,2*‡], Maëlle Pannetier[1,2‡]

[1]Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED; 78350, Jouy-en-Josas, France; [2]École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED; 94700, Maisons-Alfort, France; [3]Institute of Human Genetics, CNRS UMR9002 University of Montpellier; 34396, Montpellier, France

Abstract DMRT1 is the testis-determining factor in several species of vertebrates, but its involvement in mammalian testes differentiation, where *SRY* is the testis-determining gene, remains ambiguous. So far, DMRT1 loss-of-function has been described in two mammalian species and induces different phenotypes: Disorders of Sex Development (46, XY DSD) in men and male infertility in mice. We thus abolished DMRT1 expression by CRISPR/Cas9 in a third species of mammal, the rabbit. First, we observed that gonads from XY *DMRT1*$^{-/-}$ rabbit fetuses differentiated like ovaries, highlighting that DMRT1 is involved in testis determination. In addition to SRY, DMRT1 is required in the supporting cells to increase the expression of the *SOX9* gene, which heads the testicular genetic cascade. Second, we highlighted another function of DMRT1 in the germline since XX and XY *DMRT1*$^{-/-}$ ovaries did not undergo meiosis and folliculogenesis. XX *DMRT1*$^{-/-}$ adult females were sterile, showing that DMRT1 is also crucial for female fertility. To conclude, these phenotypes indicate an evolutionary continuum between non-mammalian vertebrates such as birds and non-rodent mammals. Furthermore, our data support the potential involvement of *DMRT1* mutations in different human pathologies, such as 46, XY DSD as well as male and female infertility.

eLife assessment

In this **important** study, the rabbit was used as a non-rodent mammalian model to show that DMRT1 has a testicular promoting function as it does in humans. The experiments are meticulous and **compelling**, and the arguments are clear and **convincing**. These results may explain the gonadal dysgenesis associated with mutations in human DMRT1 and highlight the need for mammalian models other than mice to better understand the process of gonadal sex determination in humans.

***For correspondence:** emilie.dujardin@inrae.fr (ED); eric.pailhoux@inrae.fr (EP)

[†]These authors contributed equally to this work
[‡]These authors also contributed equally to this work

Competing interest: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 17

Preprint posted 11 May 2023
Sent for Review 07 June 2023
Reviewed preprint posted 26 July 2023
Reviewed preprint revised 25 September 2023
Version of Record published 17 October 2023

Reviewing Editor: Serge Nef, University of Geneva, Switzerland

© Copyright Dujardin *et al*. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

DMRT1 (Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1) belongs to the highly conserved family of DM domain proteins, which exhibits a zinc finger DNA-binding motif that was initially identified in *Drosophilia* and *Caenorhabditis elegans* (***Erdman and Burtis, 1993***; ***Raymond et al., 1998***). Some of its orthologs have been described as Testis-Determining Factor (TDF) in vertebrate species such as medaka (*Oryzias latipes*) (***Matsuda et al., 2002***), xenope (*Xenopus laevis*) (***Yoshimoto et al., 2010***), or chicken (***Smith et al., 2009***). In the last, the Z chromosome carries the *DMRT1* gene. In ZZ males, two

eLife digest Animals that reproduce sexually have organs called gonads, the ovaries and testes, which produce eggs and sperm. These organs, which are different in males and females, originate from the same cells during the development of the embryo. As a general rule, the chromosomal sex of an embryo, which gets determined at fertilization, leads to the activation and repression of specific genes. This in turn, controls whether the cells that will form the gonads will differentiate to develop testes or ovaries.

Disruption of the key genes involved in the differentiation of the gonads can lead to fertility problems, and in some cases, it can cause the gonads to develop in the 'opposite' direction, resulting in a sex reversal. Identifying these genes is therefore essential to know how to maintain or restore fertility.

DMRT1 is a gene that drives the differentiation of gonadal cells into the testicular pathway in several species of animals with backbones, including species of fish, frogs and birds. However, its role in mammals – where testis differentiation is driven by a different gene called *SRY* – is not well understood. Indeed, when *DMRT1* is disrupted in male humans it leads to disorders of sex development, while disrupting this gene in male mice causes infertility. To obtain more information about the roles of DMRT1 in mammalian species, Dujardin et al. disrupted the gene in a third species of mammal: the rabbit.

Dujardin et al. observed that chromosomally-male rabbits lacking DMRT1 developed ovaries instead of testes, showing that in rabbits, both SRY and DMRT1 are both required to produce testes. Additionally, this effect is similar to what is seen in humans, suggesting that rabbits may be a better model for human gonadal differentiation than mice are. Additionally, Dujardin et al. were also able to show that in female rabbits, lack of DMRT1 led to infertility, an effect that had not been previously described in other species.

The results of Dujardin et al. may lead to better models for gonadal development in humans, involving DMRT1 in the differentiation of testes. Interestingly, they also suggest the possibility that mutations in this gene may be responsible for some cases of infertility in women. Overall, these findings indicate that *DMRT1* is a key fertility gene.

copies of the *DMRT1* gene are required to induce testis determination. In ZW females and ZZ chickens harboring a non-functional copy, gonads differentiate as ovaries showing that sex determination is based on DMRT1 dosage (**Ioannidis et al., 2021**).

In mammals, where the sex-determining system is XX/XY, the TDF is the *SRY* gene (Sex-determining Region of the Y chromosome) carried by the Y chromosome. Based on the mouse species, DMRT1 does not appear to have retained a crucial function in testis determination since targeted deletion of *Dmrt1* only affects post-natal testis function. In fact, DMRT1 has roles in both germ cells and supporting cells in the testis, and *Dmrt1*$^{-/-}$ males showed spermatogenesis failure with spermatogonia that did not undergo meiosis (**Matson et al., 2010**). However, specific knock-out of *Dmrt1* in adult Sertoli cells led to their transdifferentiation into granulosa cells (**Matson et al., 2011**). Although DMRT1 is not required for testis determination in mice, it retained part of its function in adulthood when it is necessary to maintain Sertoli cell identity. In ovarian differentiation, FOXL2 (Forkhead family box L2) showed a similar function discrepancy between mice and goats as DMRT1 in the testis pathway. In the mouse, *Foxl2* is expressed in female-supporting cells early in development but does not appear necessary for fetal ovary differentiation (**Uda et al., 2004**). On the contrary, it is required in adult granulosa cells to maintain female-supporting cell identity (**Ottolenghi et al., 2005**; **Uhlenhaut et al., 2009**). In other mammalian species, such as goats, *FOXL2* was shown to be crucial for ovarian determination. Indeed, naturally observed in the PIS (Polled Intersex Syndrome) mutation (**Pailhoux et al., 2001**) or experimentally induced by genome editing in goats (**Boulanger et al., 2014**), FOXL2 loss-of-function led to female-to-male sex reversal with the early development of XX testes. Following *FOXL2* absence of expression in the XX mutant gonads (XX PIS$^{-/-}$ or XX *FOXL2*$^{-/-}$), *DMRT1* was up-regulated within days before increased *SOX9* expression, which then directs the differentiation of Sertoli cells and the formation of testicular cords (**Elzaiat et al., 2014**). These observations in the goat suggested that DMRT1 could retain function in SOX9 activation and, thus, in testis determination in several mammals. In humans, a few

mutations affecting *DMRT1* have been described in patients presenting 46, XY DSD (Disorders of Sex Development) (**Chauhan et al., 2017**; **Ledig et al., 2012**; **Mello et al., 2010**). In particular, a heterozygous *de novo* point mutation in the *DMRT1* gene has been identified in a 46, XY individual with complete gonadal dysgenesis (**Murphy et al., 2015**), suggesting that DMRT1 and SRY may be involved in testicular determination.

To clarify DMRT1 functions in non-rodent mammals, we have chosen the rabbit model, where we generated a DMRT1 mutant line thanks to the CRISPR/Cas9 technology. Firstly, we characterized the DMRT1 expression in control gonads, showing that both XY and XX fetal gonads were expressing *DMRT1* before their sexual differentiation. In XY fetuses, *DMRT1* and *SRY* presented partially overlapping territory, and somatic cells expressing both of them harbored SOX9 expression and differentiated into Sertoli cells. Secondly, thanks to our CRISPR/Cas9 genetically modified rabbit model, we demonstrated that DMRT1 was required for testis differentiation since XY *DMRT1*$^{-/-}$ rabbits showed early male-to-female sex reversal with differentiating ovaries and complete female genitalia. However, germ cells failed to undergo meiosis, and follicles did not form in XY and XX *DMRT1*$^{-/-}$ mutant ovaries, leading to female infertility. Finally, we demonstrated that DMRT1 was a testis-determining factor in mammals and that it was also required for female fertility.

Results

DMRT1 is expressed in genital crests of both sexes and just after *SRY* in XY developing testes

DMRT1 expression pattern has already been reported by molecular analysis in the rabbit species from 14 days *post-coïtum* (d*pc)* to adulthood (**Daniel-Carlier et al., 2013**). We aimed to investigate further the location of the *DMRT1* expression during gonadal development, firstly at earlier stages of genital crest formation (12–13 d*pc*; **Figure 1A**) using *in situ* hybridization (ISH). *SRY* expression was already detected at 12 d*pc* and, as expected, was found only in the XY genital ridges, where it was restricted to the medullary part of the gonad (**Figure 1B**). In contrast, *DMRT1* was faintly expressed in the gonads of both sexes, in a few cells of the *medulla* under the coelomic epithelium (**Figure 1B**). At 12 d*pc*, only very few germ cells, expressing *POU5F1*, have completed their migration into the genital ridges (**Figure 1B**). Twenty-four hours later, at 13 d*pc*, the genital ridges had tripled in size in both sexes, and the territory of *SRY* expression increased within the XY developing testes (**Figure 1C**). The number of somatic cells expressing *DMRT1* was also strongly increased in both sexes, with few of them located in the coelomic epithelium (**Figure 1C**). In addition, more *POU5F1*-expressing germ cells were detected (5–12 per section instead of 1 or 2 at 12 d*pc*) (**Figure 1B, C**).

SOX9 is detected in XY medullar cells co-expressing *SRY* and DMRT1

At 14 d*pc*, the SOX9 protein was immunodetected in a few cells located in the medullary part of the XY gonad (**Figure 2**). Numerous somatic cells of this region also expressed *SRY* and DMRT1 (**Figure 2**), and a few co-expressed SOX9 and DMRT1 simultaneously (**Figure 2—figure supplement 1**). In contrast, coelomic epithelial cells only expressed DMRT1 (**Figure 2**).

At 15 d*pc*, Sertoli cells that co-express *SRY*, DMRT1, and SOX9 began to be organized into embryonic cords (**Figure 2**). At this stage, coelomic epithelial cells expressed DMRT1 but were negative for *SRY* and SOX9. Furthermore, we observed an islet of cells expressing *SRY* and DMRT1 located in the mesonephros below the boundary with the gonad (**Figure 2**, dotted line). These cells expressed PAX8 (**Figure 2—figure supplement 2**) and could correspond to the recently described supporting-like cell population contributing to the *rete testis* in mice (**Mayère et al., 2022**). As in mice, these cells will express SOX9 at the latter stages (a few of them are already SOX9 positive at 15 d*pc*), but unlike mice, they express *SRY*.

From 16 to 18 d*pc*, the development of the testicular cords proceeded. At these two stages (16 and 18 d*pc*), *SRY*, DMRT1, and SOX9 were expressed only in the Sertoli cells, where *SRY* expression began to decrease from 18 d*pc* (**Figure 2**). No more DMRT1 expression could be seen in the coelomic epithelial cells, but the tunica albuginea begins to form (**Figure 2**), and consequently, the coelomic epithelium will become the surface epithelium.

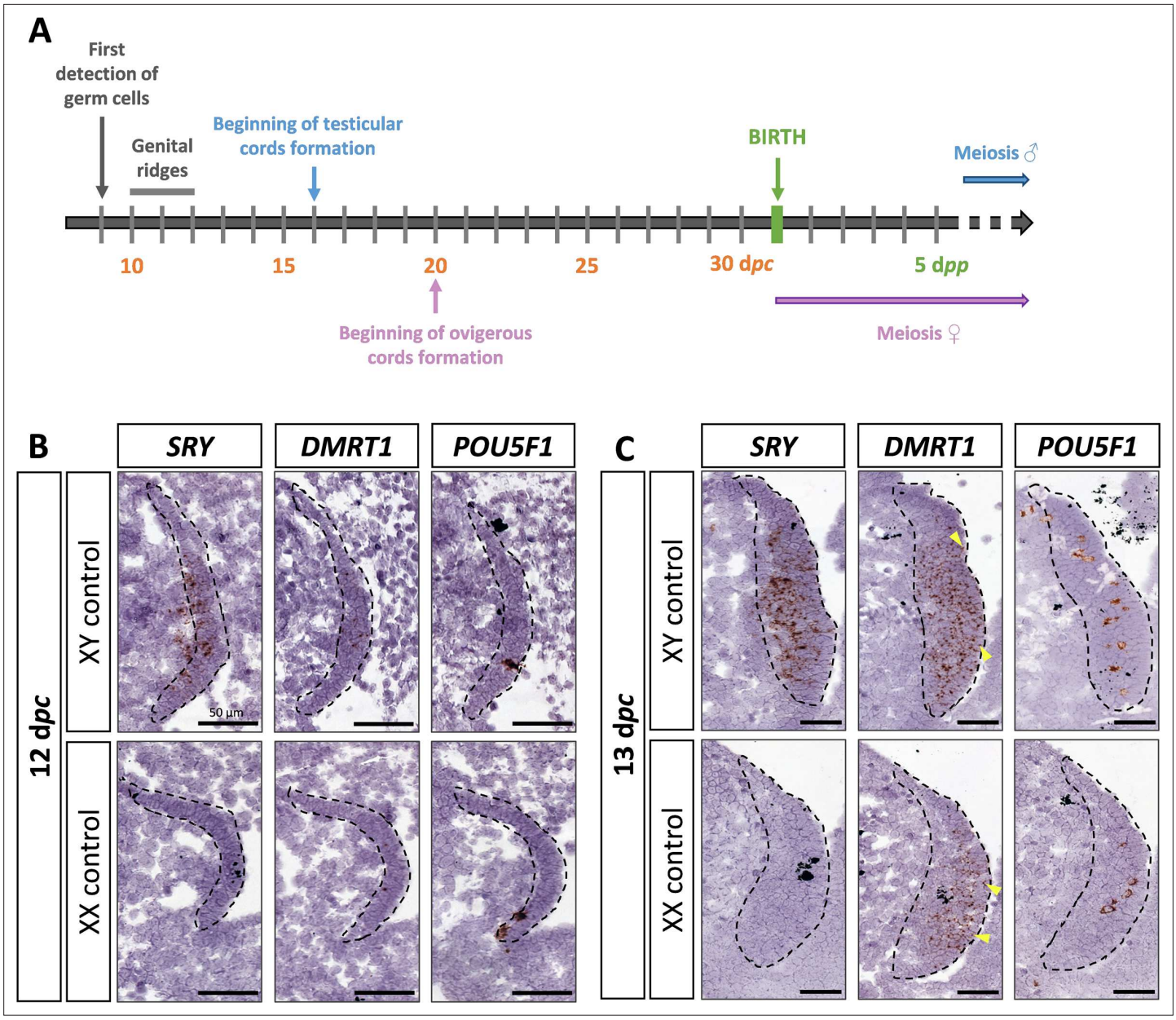


Figure 1. *SRY*, *DMRT1*, and *POU5F1* location during early gonadal development. (**A**) Key stages of gonadal development in rabbits with 31 days of gestation. Germ cells are first detected at 9 days *post-coïtum* (d*pc*), before the genital ridge formation, which occurs between 10 and 12 d*pc*. In XY gonads, testicular cords begin forming at 16 d*pc*, and germ cells enter meiosis a few months after birth. In XX gonads, the ovigerous cords appear at 20 d*pc*, and meiosis begins around birth. Location of *SRY*, *DMRT1*, and *POU5F1* by *in situ* hybridization (RNAscope technology) on XY and XX control gonads at (**B**) 12 d*pc* or (**C**) 13 d*pc*. Dotted line: developing genital crests. Yellow arrowheads: coelomic epithelial cells expressing *DMRT1*. Scale bar = 50 µm.

Persistent expression of DMRT1 in XX gonadal somatic cells until ovigerous nest formation

As described above, *DMRT1* expression started at 12 d*pc* in the gonadal somatic compartment of both sexes (***Figure 1B***). In the female gonads, *DMRT1* remained expressed in all somatic cells, including those of the coelomic epithelium, until 16 d*pc* (***Figure 3A***). Interestingly, as in XY gonads, we observed PAX8-positive cells in XX gonads at 15 d*pc* (***Figure 2—figure supplement 1***). These cells could contribute to the formation of the *rete ovarii* as in mice (***Mayère et al., 2022***). At 18 d*pc*, *DMRT1* expression decreased but persisted in some cells located in the coelomic epithelium and just below it, where ovigerous nest formation occurred. Interestingly, the female *DMRT1*-antagonist

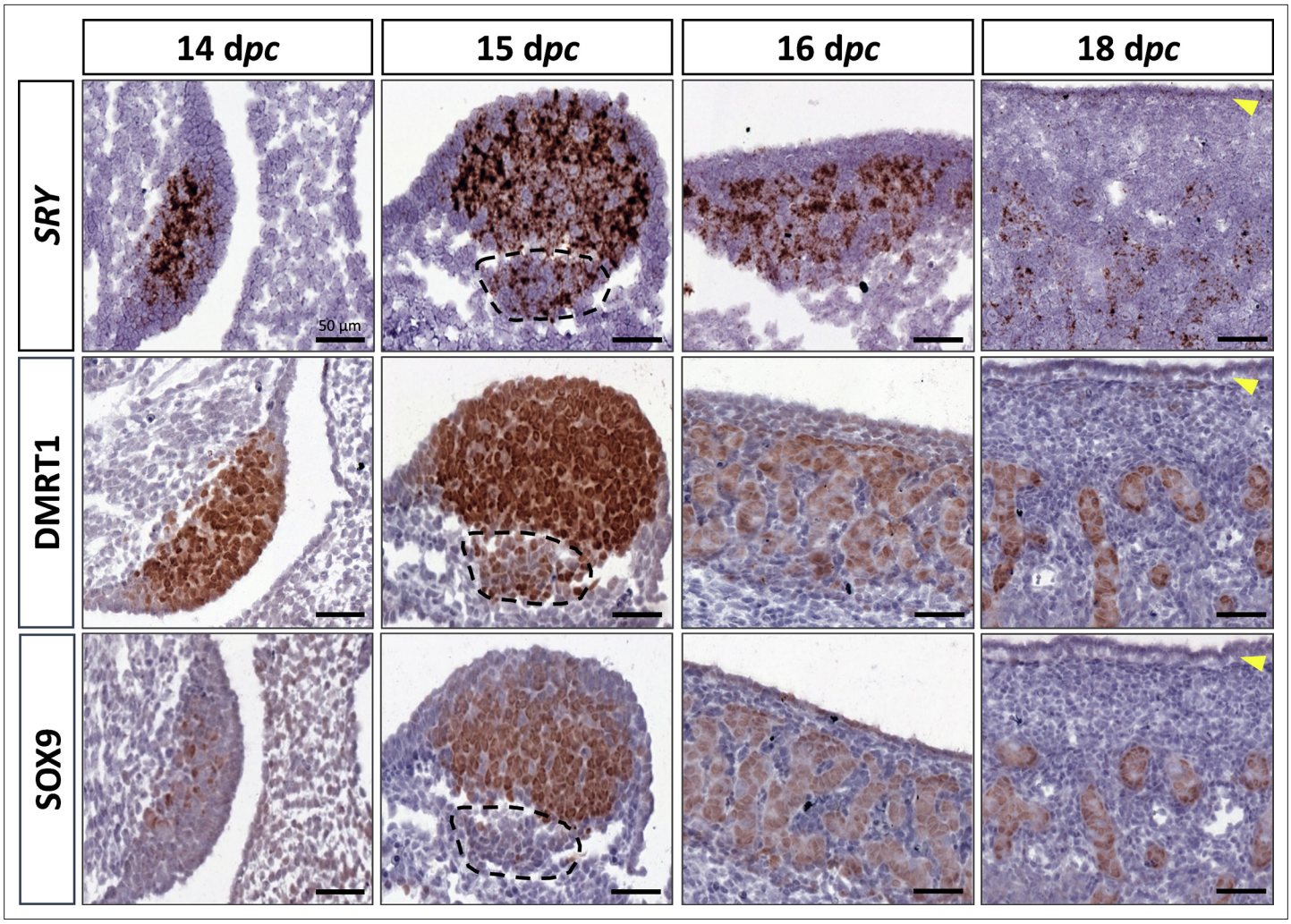


Figure 2. Somatic markers location during testis differentiation. Location of *SRY* by *in situ* hybridization (RNAscope technology), DMRT1, and SOX9 by immunohistochemistry on XY control testes from 14 to 18 d*pc*. The dotted line at 15 d*pc*: territory with cells expressing *SRY* and DMRT1 but not SOX9. Yellow arrowheads: tunica albuginea in formation. Scale bar = 50 µm.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 2:

Figure supplement 1. DMRT1 and SOX9 co-location on 14 d*pc* XY control gonad.

Figure supplement 2. Identification of PAX8-positive cells in 15 d*pc* control gonads.

gene *FOXL2* began to be expressed between 16 and 18 d*pc* when *DMRT1* expression decreased (***Figure 3B***). Thereafter, at 20 d*pc*, *DMRT1* expression was limited in some somatic cells enclosed in nascent ovigerous nests where some germinal cells also began to be positive for DMRT1 (***Figure 3C*** and ***Figure 3—figure supplement 1***). At this stage, DMRT1-positive territory seems to overlap that of RSPO1 but not that of FOXL2 located in the loose conjunctive tissue around the ovigerous nests (***Figure 3C***).

The testicular formation is impaired in *DMRT1* knock-out XY rabbits

To determine the role of DMRT1 in the rabbit species used as a non-rodent mammalian model, we engineered a *DMRT1* knock-out line using the CRISPR/Cas9 system with two RNA guides located in exon 3. The mutation carried by this line is a 47-bp duplication in sense, leading to a frameshift of the open reading frame and a premature stop codon (***Figure 4—figure supplement 1A***). This mutation does not affect *DMRT1* transcription but induces a total absence of protein as shown in post-natal gonads by western blot (***Figure 4—figure supplement 1B, C***). Thanks to this line, we first analyzed gonadal formation at 20 d*pc*, when the testis and ovary were distinguishable in control

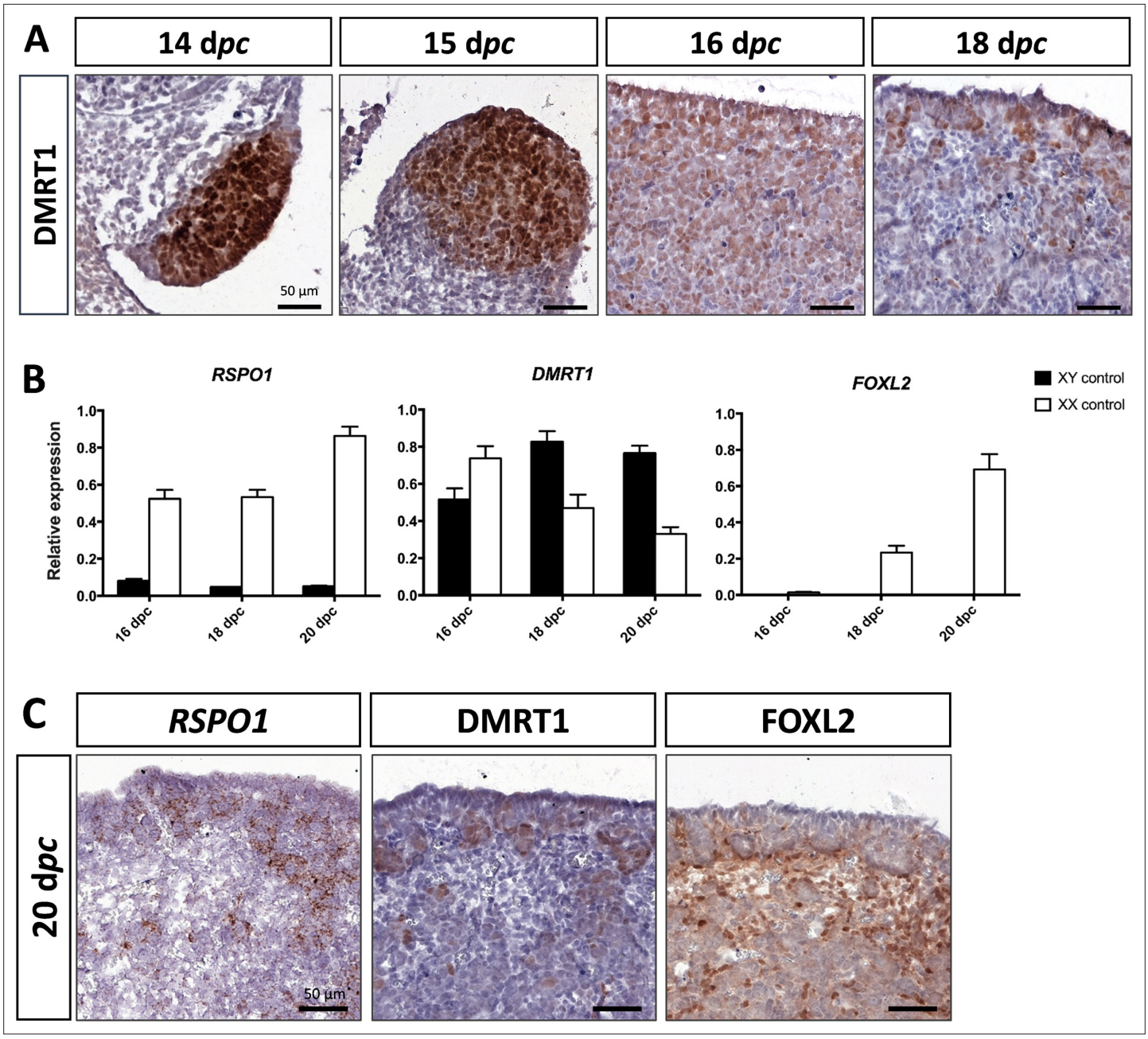


Figure 3. Somatic markers location and expression during ovarian differentiation. (**A**) Immunostaining of DMRT1 on XX control ovaries from 14 to 18 d*pc*. (**B**) Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analyses of *RSPO1*, *DMRT1*, and *FOXL2* expression from 16 to 20 d*pc* in control gonads of both sexes. The error bars correspond to the standard error of the mean (n=3-5) (**C**) *RSPO1 in situ* hybridization (RNAscope technology), immunostaining of DMRT1 and FOXL2 on 20 d*pc* control ovaries. Scale bar = 50 µm.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 3:

Figure supplement 1. DMRT1 and POU5F1 co-detection in control gonads.

animals. Indeed, at this stage, testes appeared with well-formed seminiferous cords, and ovigerous nest formation was clearly in progress in the ovaries (***Figure 4A***). At 20 d*pc*, XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads failed to engage testicular differentiation and appeared quite like control ovaries, but ovarian differentiation did not appear to be affected by the loss of *DMRT1* (***Figure 4A***). To better characterize the *DMRT1*$^{-/-}$ gonads in XY and XX fetuses, we established the gonadal transcriptome by RNA-sequencing. Heatmap representation of the 3640 differentially expressed genes in at least one of the four genotypes (adjusted p-value <0.05 and |log2FC| > 1; ***Supplementary file 1***) was clustered into

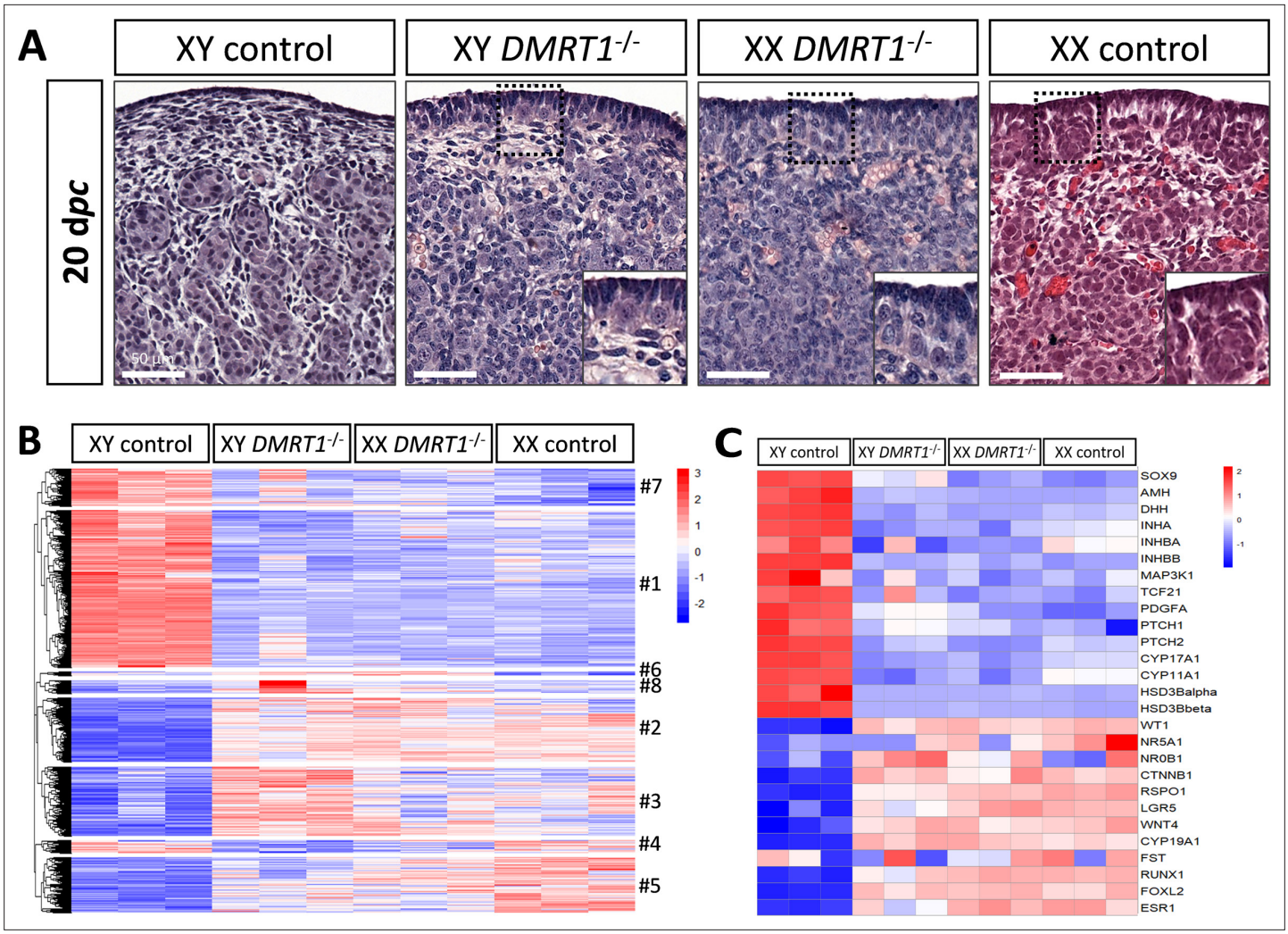


Figure 4. Ovarian-like morphology and transcriptomic signature of XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads at 20 d*pc*. (**A**) Hematoxylin and eosin staining of gonads sections from control and *DMRT1*$^{-/-}$ 20 d*pc* rabbits. The enlarged area shows the characteristic ovarian surface epithelium found on XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads. Scale bar = 50 µm. Heatmap representation of (**B**) 3460 deregulated genes (adjusted p-value <0.05 and |log2FC| > 1) or (**C**) 27 selected genes between XY control, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$, and XX control at 20 d*pc*.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 4:

Figure supplement 1. *DMRT1* mutation using CRISPR/Cas9 in rabbits.

eight groups (#1 to #8, ***Figure 4B*** and ***Supplementary file 2***). Clusters #1 and #7 contained 1331 and 315 genes, respectively, which were preferentially expressed in XY control testes. Expression of these genes was decreased in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads, harboring levels close to that of the female's ovaries (XX control or *DMRT1*$^{-/-}$). On the other hand, clusters #2, #3, and #5 (537, 582, and 464 genes, respectively) were composed of genes preferentially expressed in XX control ovaries, and their expression was increased in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads. Deep-sequencing transcriptomics confirmed the ovarian fate of XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads. The heatmap in ***Figure 4C*** also illustrates the expression for selecting some of the main genes involved in sex determination (***Figure 4C***).

Expression levels and patterns of the principal actors of gonadal differentiation were confirmed by quantitative RT-PCR (RT-qPCR), and the location of positive cells was achieved by immunohistochemistry.

As expected, *SOX9*, *AMH*, and *DHH* expression levels were decreased in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads, remaining like those detected in control or *DMRT1*$^{-/-}$ XX ovaries, while *SRY* expression was enhanced in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads (***Figure 5A***). Interestingly, we noticed a slight increase of SOX9-positive cells in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads compared to XX control or mutant ovaries (***Figure 5C***). In contrast, *FOXL2* and *CYP19A1* expression were increased in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads to similar levels to those detected in control or mutant ovaries (***Figure 5B***). By immunohistochemistry, we detected cells expressing FOXL2 in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads (***Figure 5C***). Moreover, *RSPO1* expression was increased in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads, but it remained lower than in control ovaries or in XX *DMRT1*$^{-/-}$ gonads. In the latter, the *RSPO1* expression was also lower than in control ovaries, suggesting a regulatory link between DMRT1 and RSPO1 in the female pathway (***Figure 5B***).

Germ cells failed to engage meiosis in *DMRT1* mutant gonads

After the sex determination process and the first stages of gonad formation, *DMRT1*$^{-/-}$ gonads engage a female fate and differentiate as ovaries, whatever their sex-chromosome constitution, XX or XY. Whereas the *DMRT1* expression began at 18 d*pc* in the XY germinal lineage of control gonads and 20 d*pc* in XX (***Figure 3—figure supplement 1***), its expression was abolished in both somatic and germ cells in *DMRT1*$^{-/-}$ mutant gonads (***Figure 5C***). Although XX or XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads continue to develop as ovaries, most germ cells did not engage in the meiotic process. Indeed, in control ovaries at 3 days *post-partum* (d*pp*), most germ cells were in the zygotene stage, showing nuclei with highly condensed chromatin (***Daniel-Carlier et al., 2013***; ***Figure 6***) and were positives for Ki67, showing their exit from the G0 phase of the cell cycle (***Figure 6—figure supplement 1***). In contrast, in *DMRT1*$^{-/-}$ gonads, few germ cells in the preleptotene stage were observed (***Figure 6***), and the majority did not express Ki67 but continued to express the pluripotency marker POU5F1 (***Figure 6—figure supplement 1***). Subsequently, the rupture of ovarian nests and the follicle formation did not occur in *DMRT1*$^{-/-}$ gonads. At 18 d*pp*, folliculogenesis had already started in control ovaries, where the first primordial follicles were visible in the deepest cortical part close to the *medulla* (***Figure 6***). In contrast, *DMRT1*$^{-/-}$ gonads seemed to be blocked at a pre-meiotic stage, and folliculogenesis failed to occur (***Figure 6***). In adults, *DMRT1*$^{-/-}$ gonads were reduced in size (***Figure 6—figure supplement 2***), no germ cells were detected, and some somatic cells evolved toward luteinized cells (***Figure 6***). Consequently, both XY and XX females were completely infertile in adulthood.

Discussion

Our study gave new insights into the conservation of the sex-determination genetic cascade across evolution. Although the signal controlling this process could take different forms in metazoans, several downstream transcription factors involved in gonadal differentiation have been conserved throughout evolution. For instance, *SOX9*, well known in vertebrates as being essential for Sertoli cell differentiation (***Chaboissier et al., 2004***; ***Foster et al., 1994***; ***Qin and Bishop, 2005***; ***Vidal et al., 2001***; ***Wagner et al., 1994***), has a fruit fly ancestor, *Sox100B*, which was found to be necessary for testis development in *Drosophila* (***Nanda et al., 2009***). However, the most conserved sex-differentiating factor throughout evolution is DMRT1. Indeed, it has been maintained at the head of the sex determination cascade in reptiles (***Sun et al., 2017***), fishes (***Matsuda et al., 2002***), and birds (***Smith et al., 2009***). Nevertheless, its functions could have been reduced in mammals since testis differentiates in the absence of DMRT1 (*Dmrt1*$^{-/-}$) in mice (***Raymond et al., 2000***). Our results highlight an evolutionary continuum of this gene in testis determination from birds to rabbits and non-rodent mammals in general. Interestingly, even *DMRT1* dosage sensibility has been conserved between chicken and rabbits since heterozygous XY *DMRT1*$^{+/-}$ male rabbits present secondary infertility with an arrest of spermatogenesis around 2 years of age (data not shown).

DMRT1 position in the rabbit sex-determining cascade

As the early stages of gonadal differentiation in rabbits were not fully characterized, we first determined the expressional profiles of the major sex-determining genes. We observed that DMRT1 expression started at 12 d*pc*, at the early formation of genital crests, and it was first expressed in the somatic lineage of both sexes, as in mice (***Lei et al., 2007***; ***Raymond et al., 1999***) or in humans (***Garcia-Alonso et al., 2022***). In the human fetal testis, *DMRT1* expression is co-detected with *SRY* in

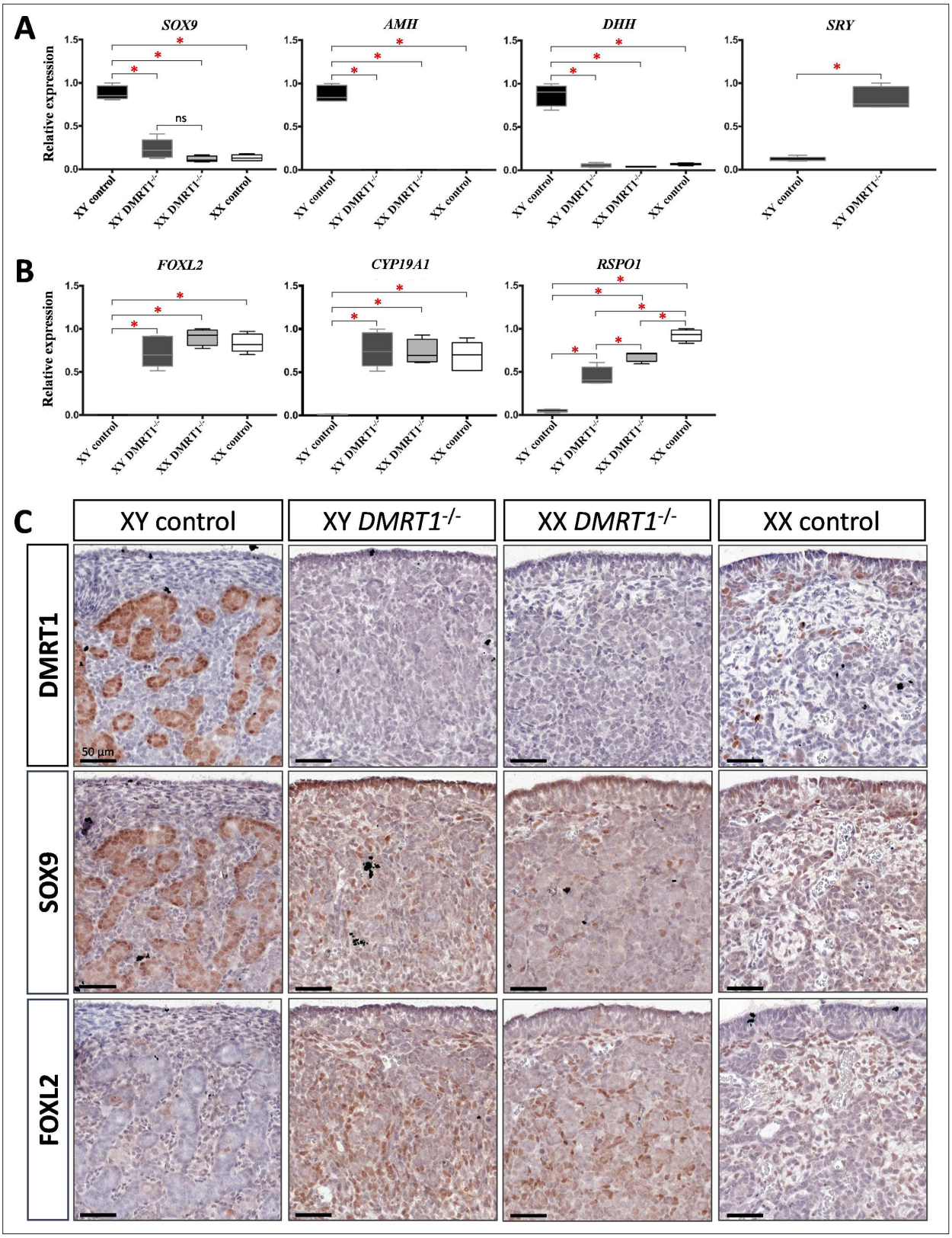


Figure 5. Somatic markers expression and location on control and *DMRT1*$^{-/-}$ gonads at 20 d*pc*. Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analyses of (**A**) testicular-related differentiation genes (*SOX9*, *AMH*, *DHH*, and *SRY*) or (**B**) ovarian-related differentiation genes (*FOXL2*, *CYP19A1*, and *RSPO1*) in XY control, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$, and XX control gonads (n = 4–5) at 20 d*pc*. Statistical analyses were performed using the non-parametric Kruskal–Wallis test, followed by a pairwise permutation test: *p-value <0.05; ns: non-significant. (**C**) Immunostaining of DMRT1, SOX9, and FOXL2 on XY control, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$, and XX control gonad sections at 20 d*pc*. Scale bar = 50 µm.

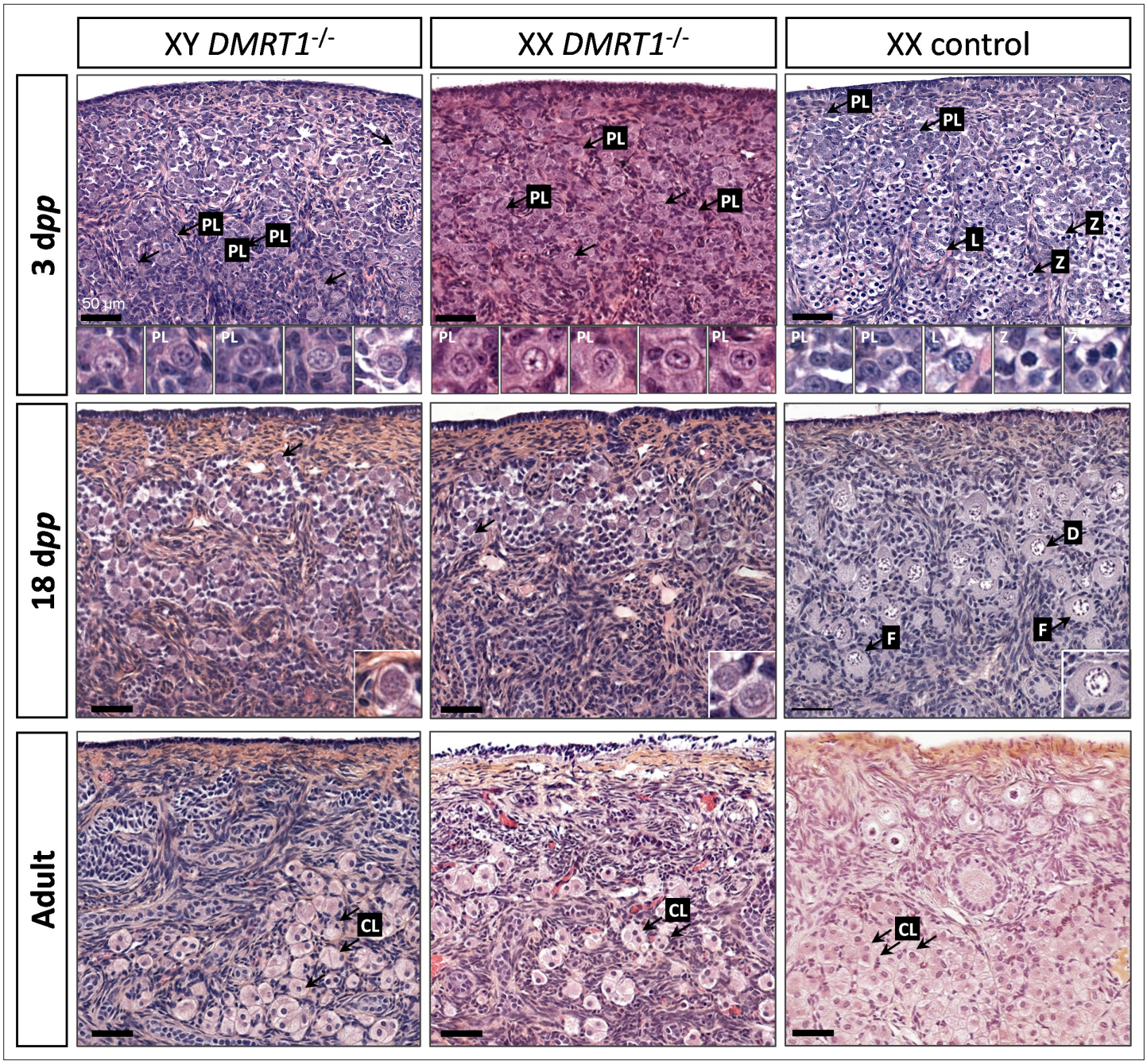


Figure 6. Evolution of gonadal morphogenesis in XY and XX *DMRT1*$^{-/-}$ rabbits. Hematoxylin and eosin staining of gonad sections from XY and XX *DMRT1*$^{-/-}$ gonads and XX control ovaries at 3 days *post-partum* (d*pp*), 18 d*pp*, and in adulthood (4–9 months). The enlargements for the first two panels correspond to the nuclei pointed by an arrow. PL: preleptotene stage; L: leptotene stage; Z: zygotene stage; D: diplotene stage; F: ovarian follicle; CL: luteal cells. Scale bar = 50 µm.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 6:

Figure supplement 1. POU5F1 and Ki67 location on control and *DMRT1*$^{-/-}$ gonads at 3 d*pp*.

Figure supplement 2. Evolution of gonadal size in XY and XX *DMRT1*$^{-/-}$ rabbits.

early supporting gonadal cells, which become Sertoli cells following the activation of SOX9 expression (***Garcia-Alonso et al., 2022***). In mice, the *Dmrt1* expression starts at E10.5 in both somatic and germinal compartments. However, we showed that germline expression was shifted by 6–8 days compared to the somatic compartment in the rabbit male and female gonads, respectively. These differences are strongly related to the timing of gonadal development in rabbits – which is longer

than in mice – and therefore allows better visualization of the different processes. These sequential DMRT1 up-regulations according to cell type and sex also argue in favor of distinct *DMRT1* promoters as already described in rats (**Lei et al., 2009**). For the somatic XY compartment, *SOX9* expression appears at 14 d*pc* in cells expressing both *DMRT1* and *SRY*, suggesting that both factors are required for *SOX9* up-regulation. This led to the Sertoli cell differentiation and testicular cords formation from 15 d*pc*. In the developing ovary, we showed that *FOXL2* increases when DMRT1 expression starts to shift from somatic cells to germ cells. Moreover, our results suggested DMRT1 involvement in *RSPO1* up-regulation in the ovary.

DMRT1 is required for testis determination in rabbits

In recent years, the advent of new genome editing technologies has made it possible to explore other animal models, such as the goat (**Boulanger et al., 2014**) or the rabbit (**Jolivet et al., 2022**), and enriching our knowledge on the conservation of ancestral genetic mechanisms in non-rodent mammals. In rabbits, the CRISPR-Cas9 technology allowed us to generate a null mutation of the *DMRT1* gene, leading to an absence of detectable protein at homozygosity. Thanks to this model, we could demonstrate that DMRT1 kept its leadership in sex determination also in mammals, where SRY stays the 'switch-on factor' for testis determination, as previously demonstrated in rabbits (**Song et al., 2017**). Very early in fetal life, XY fetuses expressing SRY but lacking DMRT1 (*DMRT1*$^{-/-}$) presented a male-to-female sex reversal. Although SRY expression was maintained in XY homozygous mutant gonads, the activation of *SOX9* expression was weak in the absence of DMRT1. Accordingly, a few cells expressing SOX9 protein were detectable, but SOX9 target genes expression were not activated in XY *DMRT1*$^{-/-}$ gonads. Thus, DMRT1 seems to be required for SRY action on its targets (i.e., *SOX9* gene activation) but also for SOX9 functions in the early fetal gonad. Interestingly, a recent study proposed that DMRT1 can act as a SOX9 pioneer factor in the post-natal testis for Sertoli cell identity maintenance (**Lindeman et al., 2021**). In rabbits, DMRT1 is required for SOX9 and SRY functions, and we hypothesize that DMRT1 might be a pioneer factor for both. In the differentiating genital crest, DMRT1 would be required to increase chromatin accessibility on specific sex-related regions, allowing SRY to bind and activate its targets and particularly the expression of *SOX9*. The crucial region for SRY binding was identified in mice more than 500 kb upstream of the *Sox9* transcription start site and named Enhancer 13 (**Gonen et al., 2018**). Conservation studies identified the homolog of Enhancer 13 in many mammalian species, including humans, cows, and rabbits, and DMRT1 consensus sites were predicted in all mammals examined except mice and rats (**Gonen et al., 2018**). In non-rodent mammals, DMRT1 might be required for chromatin remodeling on the Enhancer 13 region to enable SRY binding and *SOX9* expression since the beginning of testis differentiation. In the mouse, which evolved more rapidly, DMRT1 would no longer be necessary for SRY action because the chromatin state of the fetal supporting cells would be more permissive. This could also explain why DMRT1 does not exert any critical function in the fetal testis in mice (**Raymond et al., 2000**). In contrast, it is required for the action of SOX9 in the post-natal testis (**Lindeman et al., 2021**), where a sex-specific epigenetic signature was observed (**Garcia-Moreno et al., 2019**).

DMRT1 is required for germ cell meiosis and female fertility

In addition to its functions in testis differentiation, DMRT1 also plays a crucial role in the female gonad. Indeed, germ cells did not undergo meiosis in *DMRT1*$^{-/-}$ ovaries, and in the absence of oocyte I, germ cell cysts do not break, compromising follicle formation and female fertility. This specific phenotype is highly similar to those observed in ZW chicken ovaries lacking DMRT1 (**Ioannidis et al., 2021**), but is quite different from those described in mice. Even though fewer follicles were observed in *Dmrt1*$^{-/-}$ mice ovaries, the female remains fertile (**Krentz et al., 2011**). Interestingly in humans, one case involving *DMRT1* in premature ovarian failure has been reported (**Bartels et al., 2013**).

In rabbit fetuses, DMRT1 expression was first detected in differentiating ovarian somatic cells, at least until *FOXL2* up-regulation. However, DMRT1 has also been observed in fetal germ cells from 20 d*pc* until meiosis proceeded after birth. Consequently, germ cell pre-meiotic arrest in *DMRT1*$^{-/-}$ XX gonads could result from *DMRT1* loss-of-function in the germinal or the somatic compartment or both. In the somatic compartment, the absence of DMRT1 in XX homozygous mutants did not seem to disturb the first steps of ovarian differentiation. Nevertheless, deep-sequencing transcriptomics revealed the dysregulated expression of a few genes involved in the WNT/beta-catenin pathway. In particular, *RSPO1*, a

positive regulator of the WNT signaling, was reduced, and DKK1, a negative regulator, was increased (***Supplementary file 1*** and ***Supplementary file 2***). These two events could have the effect of limiting the beta-catenin action in both somatic and germinal ovarian cells at the beginning of their differentiation. This pathway has proven to be crucial in mice to promote germ cell meiosis (***Le Rolle et al., 2021***). Nevertheless, it cannot be the main event explaining the pre-meiotic failure, and the functions of DMRT1 in germ cells are more certainly involved. In mice, DMRT1 was shown to be involved in *Stra8* up-regulation in female germ cells and was thus related to the meiotic process (***Krentz et al., 2011***). This regulatory action also seems to be done in close collaboration with the retinoic acid pathway (***Feng et al., 2021***). The sole action of DMRT1 on *STRA8* up-regulation cannot explain the phenotype observed in rabbits where the germ cell seems to be unable to leave their pluripotency stage. It has also been demonstrated in male mice that DMRT1 acts as a regulator of spermatogonia pluripotency by directly regulating different pluripotency-associated genes, including POU5F1 (***Krentz et al., 2009***; ***Zhang et al., 2016***). This path is under exploration in our model in order to try to decipher further the critical role of DMRT1 in the germ line of both sexes.

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Biological sample (*Oryctolagus cuniniculus*)	Gonads	Hypharm	NZ1777	New Zealand rabbits
Commercial kit	RNAscope kit	ACD	322310	2.5HD assay-brown
Sequence-based reagent	RNAscope probe anti-DMRT1	ACD	410481	XM_002708188.1
Sequence-based reagent	RNAscope probe anti-SRY	ACD	803191	AY785433.1
Sequence-based reagent	RNAscope probe anti-POU5F1	ACD	513271	NM_001099957.1
Sequence-based reagent	RNAscope probe anti-RSPO1	ACD	488231	XM_002720657.2
Antibody	Anti-DMRT1 (mouse monoclonal)	Santa Cruz	sc-377167	IHC (1:500) IF (1:200) WB (1:100)
Antibody	Anti-SOX9 (rabbit polyclonal)	Francis Poulat		IHC (1:500) IF (1:200)
Antibody	Anti-FOXL2 (rabbit polyclonal)	***Boulanger et al., 2014***		IHC (1:500)
Antibody	Anti-POU5F1 (goat polyclonal)	Santa Cruz	sc-8628	IHC (1:500) IF (1:200)
Antibody	Anti-PAX8 (rabbit polyclonal)	Proteintech	10226-1-AP	IHC (1:6000)
Antibody	Anti-Ki67 (rabbit monoclonal)	Thermo Scientific	MA5-14520	IHC (1:500)
Sequence-based reagent	SRY_F	This paper	PCR primers	TGCTTACACACCAGCCAAACA
Sequence-based reagent	SRY_R	This paper	PCR primers	TTCCTGGCCGCTCACTTTAC
Sequence-based reagent	DMRT1_F	This paper	PCR primers	GGAGCCTCCCAGCACCTTA
Sequence-based reagent	DMRT1_R	This paper	PCR primers	TGCATCCTGTACTGCGAACTCA
Sequence-based reagent	SOX9_F	This paper	PCR primers	GGCTCCGACACCGAGAATACAC
Sequence-based reagent	SOX9_R	This paper	PCR primers	GAACTTGTCCTCTTCGCTCTCCTT
Sequence-based reagent	CYP19A1_F	This paper	PCR primers	GGAAGAATGCATCGACTTGAGTT
Sequence-based reagent	CYP19A1_R	This paper	PCR primers	GGGCCCAAAACCAAATGGT

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Sequence-based reagent	RSPO1_F	This paper	PCR primers	GCCCGCCTGGATACTTCGA
Sequence-based reagent	RSPO1_R	This paper	PCR primers	GGTGCAGAAGTTGTGGCTGAA
Sequence-based reagent	FOXL2_F	This paper	PCR primers	TTTCCCCTTTCCCCCATCTG
Sequence-based reagent	FOXL2_R	This paper	PCR primers	CTGAACCTTGCACCCAGCAT
Sequence-based reagent	AMH_F	This paper	PCR primers	GCTCATCCCCGAGACCTAC
Sequence-based reagent	AMH_R	This paper	PCR primers	CATCTTCAACAGCAGCACC
Sequence-based reagent	DHH_F	This paper	PCR primers	GCAATAAGTACGGGCTGCTG
Sequence-based reagent	DHH_R	This paper	PCR primers	GGCCAGGGAGTTATCAGCTT
Software	qBase+	Biogazelle		
Software	GraphPad Prism	GraphPad Software		

Animals

New Zealand rabbits (NZ1777, Hypharm, Roussay, France) were bred at the SAAJ rabbit facility (Jouy-en-Josas, France). All experiments were performed with the approval of the French Ministry MENESR (accreditation number APAFIS#685 and #21451) and following the guidelines issued by the local committee for ethics in animal experimentation (COMETHEA, Jouy-en-Josas). All scientists working directly with the animals possessed an animal experimentation license delivered by the French veterinary services. Hormonal superovulation treatments and surgical embryo transfer procedures were performed as previously described (***Peyny et al., 2020***).

Generation of mutant rabbits

Two guide RNAs were designed (http://crispor.trefor.net/) to target the third exon, as shown in ***Figure 4—figure supplement 1A***. Embryos produced from superovulated females were injected at the single-cell stage with a mixture of the two sgRNAs (10 ng/µl each) and the Cas9mRNA (10 ng/µl) in the injection buffer. Injected embryos were implanted 3–4 hr after into the oviducts of anesthetized recipient rabbits via laparotomy. Details concerning the handling of females and embryos have been described elsewhere (***Peyny et al., 2020***).

Offspring were screened for the presence of InDel mutations using genomic DNA extracted from ear clips (***Jolivet et al., 2014***). Founders were detected by PCR using one set of primers (***Table 1***) surrounding the position of the targeted region in exon III (***Figure 4—figure supplement 1A***). The amplified fragment was sequenced (Eurofins Genomics, Courtaboeuf, France), and the mutation was deduced by comparing it with the sequence of a wild-type rabbit. The same set of primers was used for the routine screening of descendants. The presence/absence of the Y chromosome was deduced from the amplification of the SRY gene through PCR analyses (***Table 1***). In the present paper, mentions of the XY or XX genotype always refer to the PCR determination.

XY and XX *DMRT1*$^{+/-}$ rabbits were viable until adulthood and did not appear to have any diseases. *DMRT1*$^{-/-}$ mutants were obtained by crossing XY *DMRT1*$^{+/-}$ and XX *DMRT1*$^{+/-}$ animals.

Histological and immunohistological analyses

Immediately after sampling, whole embryos or gonads were immersed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) or Bouin's fixative. After 72–96 hr of fixation at 4°C, tissues were washed three times with PBS, and stored at 4°C in 70% ethanol until paraffin inclusions. Adjacent sections of 5 µm thick were processed using a microtome (Leica RM2245) and organized on Superfrost Plus Slides (J18000AMNZ, Epredia). Before staining or experiments, sections were deparaffinized and rehydrated in successive baths of xylene and ethanol at room temperature.

Hematoxylin–eosin–saffron (HES) staining was performed by the @Bridge platform (INRAE, Jouy-en-Josas, France) using an automatic Varistain Slide Stainer (Thermo Fisher Scientific).

ISH was performed using the RNAscope ISH methodology (ACD, Bio-Techne SAS, Rennes, France) when no reliable antibody could be used to characterize the target protein. Briefly, 5 µm sections

Table 1. Primers used for genotyping PCR or quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analyses.

Gene	Forward (5′–3′)	Reverse (3′–5′)
Genotyping PCR		
DMRT1	TTTGAGCTGTGTCCCCAGAGT	ACCTCCCCAGAAGAAGAATCG
SRY	GTTCGGAGCACTGTACAGCG	GCGTTCATGGGTCGCTTGAC
RT-qPCR analyses		
SRY	TGCTTACACACCAGCCAAACA	TTCCTGGCCGCTCACTTTAC
DMRT1	GGAGCCTCCCAGCACCTTA	TGCATCCTGTACTGCGAACTCA
SOX9	GGCTCCGACACCGAGAATACAC	GAACTTGTCCTCTTCGCTCTCCTT
CYP19A1	GGAAGAATGCATCGACTTGAGTT	GGGCCCAAAACCAAATGGT
ESR1	TCCTCATCCTCTCCCACATC	AGCATCTCCAGCAACAGGTC
RSPO1	GCCCGCCTGGATACTTCGA	GGTGCAGAAGTTGTGGCTGAA
FOXL2	TTTCCCCTTTCCCCCATCTG	CTGAACCTTGCACCCAGCAT
AMH	GCTCATCCCCGAGACCTAC	CATCTTCAACAGCAGCACC
DHH	GCAATAAGTACGGGCTGCTG	GGCCAGGGAGTTATCAGCTT
H2AFX	ACCTGACGGCCGAGATCCT	CGCCCAGCAGCTTGTTGAG
YWHAZ	GGGTCTGGCCCTTAACTTCTCT	AGCAATGGCTTCATCAAAAGC
SF1 (splicing factor 1)	GCTTCCGACTGCAAATTCCA	TCACCCAGTTCAGCCATGAG

from PFA-fixed tissue were labeled using RNAscope 2.5HD assay-brown kit (322310, ACD) and 1000 nucleotides long probes designed and produced by the manufacturer (list of all synthesized probes used in ***Table 2***). Brown labeling was observed as a visible signal, and hybridization was considered to be positive when at least one dot was observed in a cell.

Immunohistochemistry (IHC) was performed using the ABC amplification signal kit (PK-6100, Vector Laboratories) and DAB enzymatic reaction (SK-4100, Vector Laboratories). Briefly, the antigenic sites were unmasked with a citrate buffer (pH 6; H-3300, Vector Laboratories), and endogenous peroxidases were blocked with a 3% H_2O_2 solution (H1009, Sigma-Aldrich). Sections were then permeabilized with 1× PBS, 1% bovine serum albumin (A7906, Sigma-Aldrich), and 0.2% saponin (7395, Merck) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (***Table 3***). Following PBS washes, sections were incubated with biotinylated secondary antibodies (***Table 3***). After ABC kit incubation and DAB revelation, hematoxylin staining was briefly performed to visualize the whole tissue.

Immunofluorescence (IF) was performed using Tyramide SuperBoost kit for primary rabbit antibody (B40944, Thermo Fisher) as recommended by the manufacturer. Other secondary antibodies used are listed in ***Table 3***.

All stained sections were scanned using a 3DHISTECH panoramic scanner at the @Bridge platform (INRAE, Jouy-en-Josas, France).

Total RNA extraction and RT-qPCR

Immediately after sampling, 16–20 d*pc* gonads were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C until extraction. Total RNAs were isolated using Trizol reagent (15596018, Life Technologies),

Table 2. Synthesized probes used for *in situ* hybridization.

Gene name	RNAscope probe catalog number	Transcript accession number
DMRT1	410481	XM_002708188.1
SRY	803191	AY785433.1
POU5F1	513271	NM_001099957.1
RSPO1	488231	XM_002720657.2

Table 3. List of antibodies used for immunohistochemistry (IHC), immunofluorescence (IF), or western blot (WB).

	Antibody name	Reference	Dilution
Primary antibodies	Mouse monoclonal to DMRT1	sc-377167 (Santa Cruz)	1/500 (IHC); 1/200 (IF); 1/100 (WB)
	Rabbit polyclonal to SOX9	Francis Poulat	1/500 (IHC); 1/200 (IF)
	Rabbit polyclonal to FOXL2	***Boulanger et al., 2014***	1/500 (IHC)
	Goat polyclonal to POU5F1	sc-8628 (Santa Cruz)	1/500 (IHC); 1/200 (IF)
	Rabbit polyclonal to PAX8	10336-1-AP (Proteintech)	1/6000 (IHC)
	Rabbit monoclonal to Ki67	MA5-14520 (Thermo Scientific)	1/500 (IHC)
Biotinylated secondary antibodies (IHC)	Horse anti-rabbit	BA-1100 (Vector Laboratories)	1/200
	Anti-mouse	Included in M.O.M. kit (BMK-2202, Vector Laboratories)	1/200
	Horse anti-goat	BA-9500 (Vector Laboratories)	1/200
Secondary antibodies (IF)	Poly HRP-conjugated goat anti-rabbit	B40944 (Invitrogen)	No diluted
	DyLight 488 goat anti-mouse	072-03-18-06 (KPL)	1/200
	Alexa Fluor 594 chicken anti-goat	A21468 (Life technologies)	1/200

purified with the RNeasy Micro kit (74004, QIAGEN) following the manufacturer's instructions, and then DNAse treated (1023460, QIAGEN). RNAs were quantified with a Qubit Fluorometric Quantification kit (Q32852, Life Technologies).

Reverse transcription of 50–100 ng RNAs using the Maxima First-Strand cDNA Synthesis Kit (K1641, Thermo Scientific) was down. qPCR with diluted cDNA was performed in duplicate for all tested genes with the Step One system (Applied Biosystems) and Fast SYBR Green Master Mix (4385612, Applied Biosystems). *H2AFX* and *YWHAZ* or *SF1* (Splicing Factor 1) were used as the reference genes to normalize the results with qBase^{+} software (Biogazelle NV, Ghent, Belgium). The sequences of the primers used are listed in ***Table 1***.

For each experiment, values were plotted using GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Statistical analyses of data from 20 d*pc* control and *DMRT1*$^{-/-}$ gonads were performed under R studio software. Because of the small number of samples in each group, comparisons were made using the Kruskal–Wallis rank sum test followed by pairwise permutation *t*-tests (1000 permutations, p-value adjusted with the Benjamini–Hochberg method).

Nuclear proteins extraction and western blot

Gonads from newborns (1–3 days *post-partum*) rabbits were collected and snap-frozen in liquid nitrogen and then stored at −80°C. Frozen gonads were crushed in liquid nitrogen using a mortar. Powdered tissue samples were immediately resuspended in homogenization buffer (10 mM HEPES pH 7.7; 25 mM KCl; 2 mM Sucrose; 0.5 mM EGTA pH 8; 0.15 mM Spermin; 0.5 mM Spermidin; 0.5 mM Dithiothreitol (DTT); 2 mM Benzamidin; 0.5 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, 118361700001)) plus 0.3% IGEPAL (3021, Sigma-Aldrich). After centrifugation for 15 min at 4°C and 3500 rpm, supernatants containing cytosolic proteins were stored at −80°C. Pellets were centrifugated for 1 hr at 4°C and 12,700 rpm and then resuspended with [C-NaCl] buffer (20 mM HEPES pH 7.7; 1.5 mM $MgCl_2$; 0.2 mM EDTA; 25% glycerol; 0.5 mM PMSF; 0.5 mM DTT; 2 mM Benzamidin; cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail). NaCl was added, lysates were rotated for 1 hr at 4°C and then centrifugated for 30 min at 4°C and 12,700 rpm. Supernatants containing nuclear extracts were collected, and the amount of protein was determined by the Bradford method.

Protein (20 µg of each sample) was separated on 4–15% polyacrylamide gel (456-1083, Bio-Rad) and then transferred into a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was blocked in 4% milk (Difco Skim Milk #232100 diluted in PBS-Tween 2%) and incubated overnight with primary antibodies mouse anti-DMRT1 (***Table 3***) or mouse anti-beta Actin (1/5000; GTX26276, Genetex). After washes, the membrane was incubated for 1 hr at room temperature with the secondary antibody

anti-mouse IgG peroxidase-conjugated (1/500; A5906, Sigma-Aldrich). The revelation was performed using Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (32312, Thermo Fisher), and the signal was observed with the Chemi-Doc Touch Imaging System (Bio-Rad). For rehybridization, the membrane was stripped for 10 min in Restore Western Blot stripping buffer (21059, Thermo Fisher).

RNA-sequencing and bioinformatics analysis

Total RNAs were extracted from control and *DMRT1*$^{-/-}$ rabbit gonads at 20 d*pc* (*n* = 3 for each phenotype and each sex). Total RNA quality was verified on an Agilent 2100 Bioanalyser (Matriks, Norway), and samples with a RIN >9 were made available for RNA-sequencing. This work benefited from the facilities and expertise of the I2BC High-throughput Sequencing Platform (https://www.i2bc.paris-saclay.fr/sequencing/ng-sequencing/ Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France) for oriented library preparation (Illumina Truseq RNA Sample Preparation Kit) and sequencing (paired-end 50–35 bp; NextSeq500). More than 37 million 50–35 bp paired-end reads per sample were generated. Demultiplexing was done (bcl2fastq2-2.18.12), and adapters were removed (Cutadapt1.15) at the I2BC High-throughput Sequencing Platform. Only reads longer than 10 pb were used for analysis. Quality control of raw RNA-Seq data was processed by FastQC v0.11.5.

Reads were mapped on all the genes of a better-annotated rabbit genome. Indeed, we improved the current reference rabbit transcriptome (OryCun2.0; *Oryctolagus cuniculus*, Ensembl version 106). For this purpose, we extended the 5′ and 3′-UTRs of genes using rabbit gonad RNA-seq data available in public databases (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB26840). In addition, the annotation and for some of them, sequences of 22 marker genes of gonadal differentiation missing or wrong in OryCun2.0 was added or fixed to this genome assembly. Then, after mapping with STAR version 2.5.1b (***Dobin et al., 2013***), reads were counted using FeatureCounts version 1.4.5 (***Liao et al., 2014***). Data normalization and single-gene level analyses of differential expression were performed using DESeq2 (***Love et al., 2014***). Differences were considered to be significant for Benjamini–Hochberg adjusted p-values <0.05, and absolute fold log2FC >1 (***Benjamini and Hochberg, 1995***). RNA-seq data were deposited via the SRA Submission portal (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA899447), BioProject ID PRJNA899447.

Acknowledgements

The authors would like to thank Patrice Congar, Gwendoline Morin, and all the staff of the facility (SAAJ, INRAE, Jouy-en-Josas, France) for the care of the rabbits, Erwana Harscoët and Nathalie Daniel for injecting the embryos, Laurent Boulanger for the sgRNAs design, Nathalie Daniel-Carlier for the mutation characterization, Julie Rivière and Marthe Vilotte (UMR GABI, INRAE, Jouy-en-Josas, France) for their assistance on the histological platform (@Bridge platform) and the access to the virtual slide scanner, Namya Mellouk for her contribution to the dissection of the gonads, Simon Herman (Université Paris-Saclay, France) for his contribution to the improvement of the rabbit genome annotation during his master's internship in our team (DGP, UMR BREED, INRAE, Jouy-en-Josas, France), and Andrew Crawford (Academic Writing Center, Centralesupélec, France) for the English proofreading. Francis Poulat kindly provided the SOX9 antibody. We acknowledge the sequencing and bioinformatics expertise of the I2BC High-throughput sequencing facility, supported by France Génomique (funded by the French National Program 'Investissement d'Avenir' ANR-10-INBS-09). We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, France, https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12) for providing computing and storage resources. This work was supported by ANR (Agence Nationale de la Recherche) grants (RNA-SEX: ANR-19-CE14-0012; ARDIGERM: ANR-20-CE14-0022). ED was supported by the ANR RNA-SEX and the PHASE department of INRAE.

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	ANR-19-CE14-0012	Eric Pailhoux Emilie Dujardin
Agence Nationale de la Recherche	ARDIGERM: ANR-20-CE14-0022	Eric Pailhoux
INRAE, France's National Research Institute for Agriculture, Food and Environment		Emilie Dujardin

The funders had no role in study design, data collection, and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Emilie Dujardin, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review and editing; Marjolaine André, Aurélie Dewaele, Francis Poulat, Methodology, Writing – review and editing; Béatrice Mandon-Pépin, Anne Frambourg, Dominique Thépot, Luc Jouneau, Investigation, Methodology, Writing – review and editing; Geneviève Jolivet, Conceptualization, Methodology, Writing – review and editing; Eric Pailhoux, Maëlle Pannetier, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Writing – original draft, Writing – review and editing

Author ORCIDs

Emilie Dujardin https://orcid.org/0000-0002-8189-8742
Béatrice Mandon-Pépin http://orcid.org/0000-0002-5424-0822
Francis Poulat http://orcid.org/0000-0003-2070-1296
Maëlle Pannetier https://orcid.org/0000-0002-5826-619X

Ethics

All experiments were performed with the approval of the French Ministry MENESR (accreditation number APAFIS#685 and #21451) and following the guidelines issued by the local committee for ethics in animal experimentation (COMETHEA, Jouy-en-Josas). All scientists working directly with the animals possessed an animal experimentation license delivered by the French veterinary services.

Peer review material

Reviewer #1 (Public Review): https://doi.org/10.7554/eLife.89284.3.sa1
Reviewer #2 (Public Review): https://doi.org/10.7554/eLife.89284.3.sa2
Reviewer #3 (Public Review): https://doi.org/10.7554/eLife.89284.3.sa3
Author Response https://doi.org/10.7554/eLife.89284.3.sa4

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. List of DEGs in *DMRT1*$^{-/-}$ gonads (XY and XX) compared to control gonads (XY and XX) (adjusted p-value <0.05 and |log2FC| > 1). List of deregulated genes (DEGs) between KO-XY vs Control-XY gonads (sheet 1), KO-XY vs KO-XY gonads (sheet 2), KO-XX vs Control-XX gonads (sheet 3), and Control-XY vs Control-XX gonads (sheet 4). The gene name of DEGs was based on their annotation or human homology (***Craig et al., 2012***).
- Supplementary file 2. Clustering and expression values (TPM, transcripts per million) of the 3460 DEGs. Cluster membership of the 3460 DEGs with their expression data (TPM) according to the four genotypes (XY control, XY DMRT1$^{-/-}$, XX DMRT1$^{-/-}$, XX control).
- MDAR checklist

Data availability

RNA-seq data were deposited via the SRA Submission portal, BioProject ID PRJNA899447.

The following dataset was generated:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Dujardin E, Andre M, Dewaele A, Mandon-Pépin B, Poulat F, Frambourg A, Thépot D, Jouneau L, Jolivet G, Pailhoux E, Pannetier M	2023	RNA-seq of Oryctolagus cuniculus	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA899447	NCBI Sequence Read Archive, PRJNA899447

References

Bartels I, Pütz I, Reintjes N, Netzer C, Shoukier M. 2013. Normal intelligence and premature ovarian failure in an adult female with a 7.6 Mb de novo terminal deletion of chromosome 9p. *European Journal of Medical Genetics* **56**:458–462. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2013.06.002, PMID: 23811035

Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**:289–300. DOI: https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

Boulanger L, Pannetier M, Gall L, Allais-Bonnet A, Elzaiat M, Le Bourhis D, Daniel N, Richard C, Cotinot C, Ghyselinck NB, Pailhoux E. 2014. FOXL2 Is a Female Sex-Determining Gene in the Goat. *Current Biology* **24**:404–408. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.039

Chaboissier M-C, Kobayashi A, Vidal VIP, Lützkendorf S, van de Kant HJG, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A. 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* **131**:1891–1901. DOI: https://doi.org/10.1242/dev.01087, PMID: 15056615

Chauhan V, Jyotsna VP, Jain V, Khadgawat R, Dada R. 2017. Novel Heterozygous Genetic Variants in Patients with 46,XY Gonadal Dysgenesis. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme* **49**:36–42. DOI: https://doi.org/10.1055/s-0042-114778, PMID: 27711951

Craig DB, Kannan S, Dombkowski AA. 2012. Augmented annotation and orthologue analysis for Oryctolagus cuniculus: Better Bunny. *BMC Bioinformatics* **13**:84. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-84, PMID: 22568790

Daniel-Carlier N, Harscoët E, Thépot D, Auguste A, Pailhoux E, Jolivet G. 2013. Gonad differentiation in the rabbit: evidence of species-specific features. *PLOS ONE* **8**:e60451. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060451, PMID: 23593221

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**:15–21. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635, PMID: 23104886

Elzaiat M, Jouneau L, Thépot D, Klopp C, Allais-Bonnet A, Cabau C, André M, Chaffaux S, Cribiu EP, Pailhoux E, Pannetier M. 2014. High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats. *Biology of Reproduction* **91**:153. DOI: https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.122796, PMID: 25395674

Erdman SE, Burtis KC. 1993. The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *The EMBO Journal* **12**:527–535. DOI: https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05684.x

Feng CW, Burnet G, Spiller CM, Cheung FKM, Chawengsaksophak K, Koopman P, Bowles J. 2021. Identification of regulatory elements required for *Stra8* expression in fetal ovarian germ cells of the mouse. *Development* **148**:dev194977. DOI: https://doi.org/10.1242/dev.194977, PMID: 33574039

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**:525–530. DOI: https://doi.org/10.1038/372525a0, PMID: 7990924

Garcia-Alonso L, Lorenzi V, Mazzeo CI, Alves-Lopes JP, Roberts K, Sancho-Serra C, Engelbert J, Marečková M, Gruhn WH, Botting RA, Li T, Crespo B, van Dongen S, Kiselev VY, Prigmore E, Herbert M, Moffett A, Chédotal A, Bayraktar OA, Surani A, et al. 2022. Single-cell roadmap of human gonadal development. *Nature* **607**:540–547. DOI: https://doi.org/10.1038/s41586-022-04918-4, PMID: 35794482

Garcia-Moreno SA, Futtner CR, Salamone IM, Gonen N, Lovell-Badge R, Maatouk DM. 2019. Gonadal supporting cells acquire sex-specific chromatin landscapes during mammalian sex determination. *Developmental Biology* **446**:168–179. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.12.023, PMID: 30594505

Gonen N, Futtner CR, Wood S, Garcia-Moreno SA, Salamone IM, Samson SC, Sekido R, Poulat F, Maatouk DM, Lovell-Badge R. 2018. Sex reversal following deletion of a single far upstream enhancer of Sox9. *Science* **360**:1469–1473. DOI: https://doi.org/10.1126/science.aas9408

Ioannidis J, Taylor G, Zhao D, Liu L, Idoko-Akoh A, Gong D, Lovell-Badge R, Guioli S, McGrew MJ, Clinton M. 2021. Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. *PNAS* **118**:e2020909118. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2020909118, PMID: 33658372

Jolivet G, Braud S, DaSilva B, Passet B, Harscoët E, Viglietta C, Gautier T, Lagrost L, Daniel-Carlier N, Houdebine LM, Harosh I. 2014. Induction of body weight loss through RNAi-knockdown of APOBEC1 gene expression in transgenic rabbits. *PLOS ONE* **9**:e106655. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106655, PMID: 25216115

Jolivet G, Daniel-Carlier N, Harscoët E, Airaud E, Dewaele A, Pierson C, Giton F, Boulanger L, Daniel N, Mandon-Pépin B, Pannetier M, Pailhoux E. 2022. Fetal estrogens are not involved in sex determination but critical for early ovarian differentiation in rabbits. *Endocrinology* **163**:bqab210. DOI: https://doi.org/10.1210/endocr/bqab210, PMID: 34614143

Krentz AD, Murphy MW, Kim S, Cook MS, Capel B, Zhu R, Matin A, Sarver AL, Parker KL, Griswold MD, Looijenga LHJ, Bardwell VJ, Zarkower D. 2009. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *PNAS* **106**:22323–22328. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0905431106, PMID: 20007774

Krentz AD, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. 2011. DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary. *Developmental Biology* **356**:63–70. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.658, PMID: 21621532

Ledig S, Hiort O, Wünsch L, Wieacker P. 2012. Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *European Journal of Endocrinology* **167**:119–124. DOI: https://doi.org/10.1530/EJE-12-0136, PMID: 22573722

Lei N, Hornbaker KI, Rice DA, Karpova T, Agbor VA, Heckert LL. 2007. Sex-specific differences in mouse DMRT1 expression are both cell type- and stage-dependent during gonad development. *Biology of Reproduction* **77**:466–475. DOI: https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058784, PMID: 17567962

Lei N, Karpova T, Hornbaker KI, Rice DA, Heckert LL. 2009. Distinct transcriptional mechanisms direct expression of the rat Dmrt1 promoter in sertoli cells and germ cells of transgenic mice. *Biology of Reproduction* **81**:118–125. DOI: https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072314, PMID: 19264703

Le Rolle M, Massa F, Siggers P, Turchi L, Loubat A, Koo BK, Clevers H, Greenfield A, Schedl A, Chaboissier MC, Chassot AA. 2021. Arrest of WNT/β-catenin signaling enables the transition from pluripotent to differentiated germ cells in mouse ovaries. *PNAS* **118**:e2023376118. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2023376118, PMID: 34301885

Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**:923–930. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656, PMID: 24227677

Lindeman RE, Murphy MW, Agrimson KS, Gewiss RL, Bardwell VJ, Gearhart MD, Zarkower D. 2021. The conserved sex regulator DMRT1 recruits SOX9 in sexual cell fate reprogramming. *Nucleic Acids Research* **49**:6144–6164. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkab448, PMID: 34096593

Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**:550. DOI: https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8, PMID: 25516281

Matson CK, Murphy MW, Griswold MD, Yoshida S, Bardwell VJ, Zarkower D. 2010. The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *Developmental Cell* **19**:612–624. DOI: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.010, PMID: 20951351

Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* **476**:101–104. DOI: https://doi.org/10.1038/nature10239, PMID: 21775990

Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* **417**:559–563. DOI: https://doi.org/10.1038/nature751, PMID: 12037570

Mayère C, Regard V, Perea-Gomez A, Bunce C, Neirijnck Y, Djari C, Bellido-Carreras N, Sararols P, Reeves R, Greenaway S, Simon M, Siggers P, Condrea D, Kühne F, Gantar I, Tang F, Stévant I, Batti L, Ghyselinck NB, Wilhelm D, et al. 2022. Origin, specification and differentiation of a rare supporting-like lineage in the developing mouse gonad. *Science Advances* **8**:eabm0972. DOI: https://doi.org/10.1126/sciadv.abm0972, PMID: 35613264

Mello MP, Coeli FB, Assumpção JG, Castro TM, Maciel-Guerra AT, Marques-de-Faria AP, Baptista MTM, Guerra-Júnior G. 2010. Novel DMRT1 3'UTR+11insT mutation associated to XY partial gonadal dysgenesis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **54**:749–753. DOI: https://doi.org/10.1590/S0004-27302010000800015

Murphy MW, Lee JK, Rojo S, Gearhart MD, Kurahashi K, Banerjee S, Loeuille GA, Bashamboo A, McElreavey K, Zarkower D, Aihara H, Bardwell VJ. 2015. An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**:442–451. DOI: https://doi.org/10.1038/nsmb.3032, PMID: 26005864

Nanda S, DeFalco TJ, Loh SHY, Phochanukul N, Camara N, Van Doren M, Russell S. 2009. Sox100B, a *Drosophila* group E Sox-domain gene, is required for somatic testis differentiation. *Sexual Development* **3**:26–37. DOI: https://doi.org/10.1159/000200079, PMID: 19339815

Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G, Schlessinger D. 2005. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Human Molecular Genetics* **14**:2053–2062. DOI: https://doi.org/10.1093/hmg/ddi210, PMID: 15944199

Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Servel N, Taourit S, Furet JP, Fellous M, Grosclaude F, Cribiu EP, Cotinot C, Vaiman D. 2001. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nature Genetics* **29**:453–458. DOI: https://doi.org/10.1038/ng769, PMID: 11726932

Peyny M, Jarrier-Gaillard P, Boulanger L, Daniel N, Lavillatte S, Cadoret V, Papillier P, Monniaux D, Peynot N, Duranthon V, Jolivet G, Dalbies-Tran R. 2020. Investigating the role of BCAR4 in ovarian physiology and female fertility by genome editing in rabbit. *Scientific Reports* **10**:4992. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-020-61689-6, PMID: 32193429

Qin Y, Bishop CE. 2005. Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Human Molecular Genetics* **14**:1221–1229. DOI: https://doi.org/10.1093/hmg/ddi133, PMID: 15790596

Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D. 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* **391**:691–695. DOI: https://doi.org/10.1038/35618, PMID: 9490411

Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. 1999. Expression of dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Developmental Biology* **215**:208–220. DOI: https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9461

Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. 2000. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes & Development* **14**:2587–2595. DOI: https://doi.org/10.1101/gad.834100, PMID: 11040213

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. DOI: https://doi.org/10.1038/nature08298, PMID: 19710650

Song Y, Liu T, Wang Y, Deng J, Chen M, Yuan L, Lu Y, Xu Y, Yao H, Li Z, Lai L. 2017. Mutation of the Sp1 binding site in the 5′ flanking region of *SRY* causes sex reversal in rabbits . *Oncotarget* **8**:38176–38183. DOI: https://doi.org/10.18632/oncotarget.16979

Sun W, Cai H, Zhang G, Zhang H, Bao H, Wang L, Ye J, Qian G, Ge C. 2017. Dmrt1 is required for primary male sexual differentiation in Chinese soft-shelled turtle Pelodiscus sinensis. *Scientific Reports* **7**:4433. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-04938-5

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. 2004. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics* **13**:1171–1181. DOI: https://doi.org/10.1093/hmg/ddh124, PMID: 15056605

Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schütz G, Cooney AJ, Lovell-Badge R, Treier M. 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* **139**:1130–1142. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021, PMID: 20005806

Vidal VPI, Chaboissier M-C, de Rooij DG, Schedl A. 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics* **28**:216–217. DOI: https://doi.org/10.1038/90046

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**:1111–1120. DOI: https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90041-8, PMID: 8001137

Yoshimoto S, Ikeda N, Izutsu Y, Shiba T, Takamatsu N, Ito M. 2010. Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. *Development* **137**:2519–2526. DOI: https://doi.org/10.1242/dev.048751, PMID: 20573695

Zhang T, Oatley J, Bardwell VJ, Zarkower D. 2016. DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment. *PLOS Genetics* **12**:e1006293. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006293, PMID: 27583450

RESEARCH ARTICLE

Figures and figure supplements

DMRT1 is a testis-determining gene in rabbits and is also essential for female fertility

Emilie Dujardin *et al*.

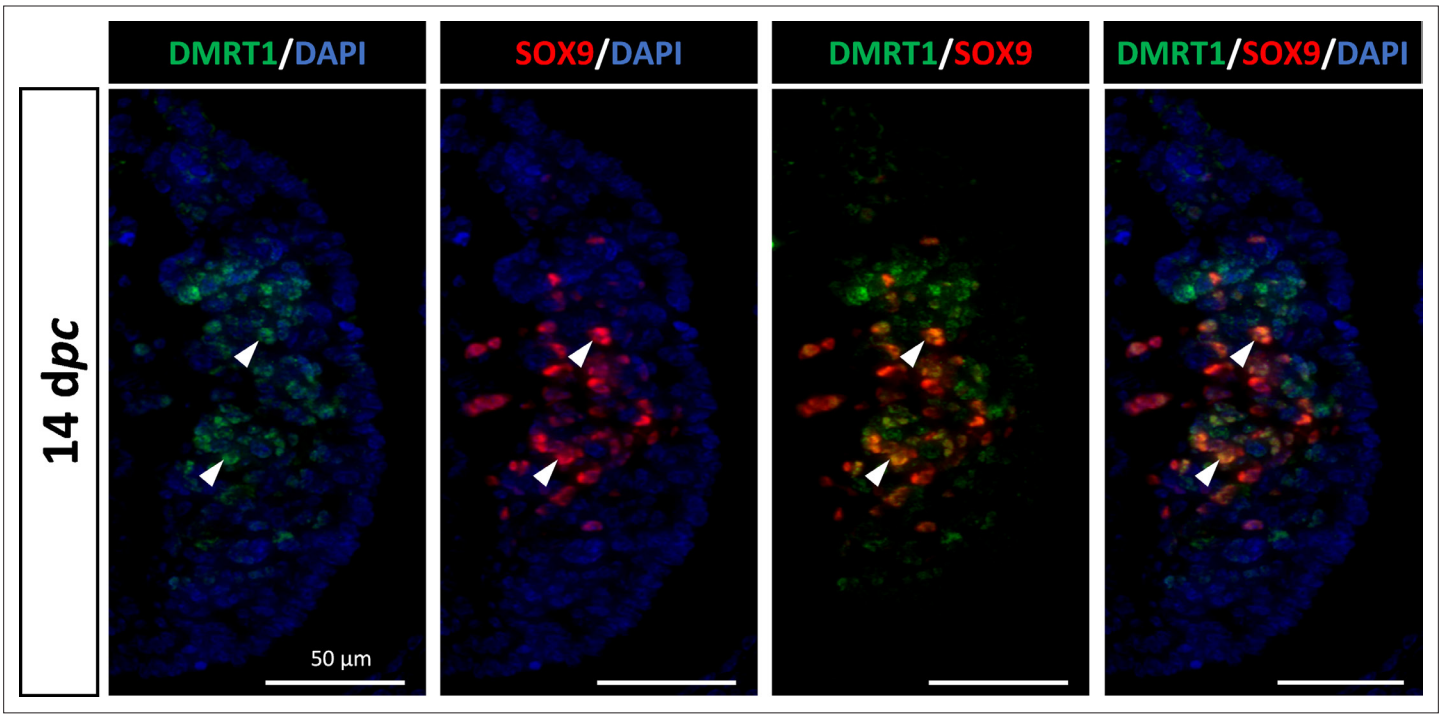


Figure 2—figure supplement 1. DMRT1 and SOX9 co-location on 14 d*pc* XY control gonad. DMRT1 (green) and SOX9 (red) immunodetection in XY control gonad at 14 d*pc*. Nuclei were stained in blue (DAPI). Arrowheads: cells co-expressing DMRT1 and SOX9. Scale bar = 50 µm.

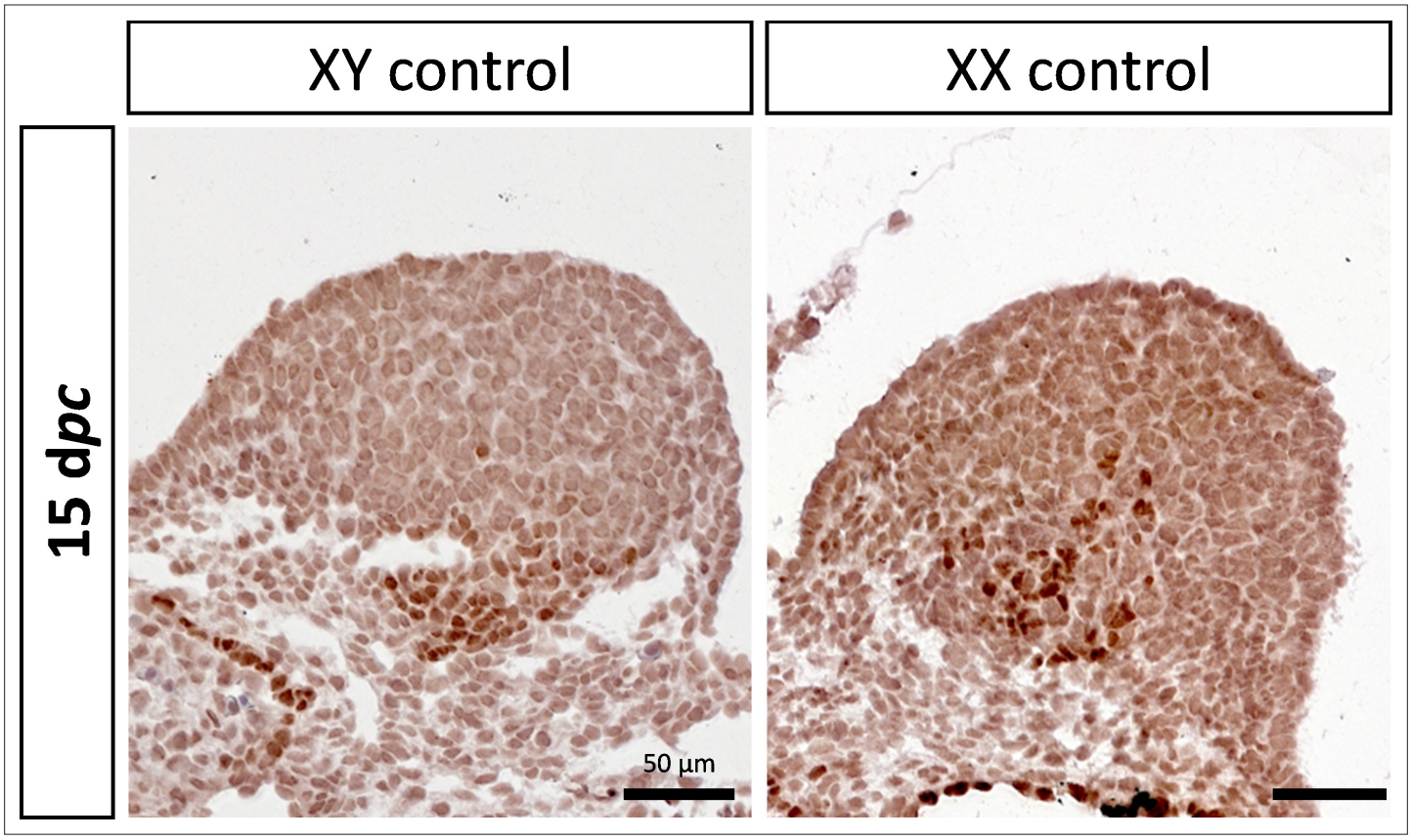


Figure 2—figure supplement 2. Identification of PAX8-positive cells in 15 d*pc* control gonads. Immunostaining of PAX8 in XY and XX control gonads at 15 d*pc*. Scale bar = 50 µm.

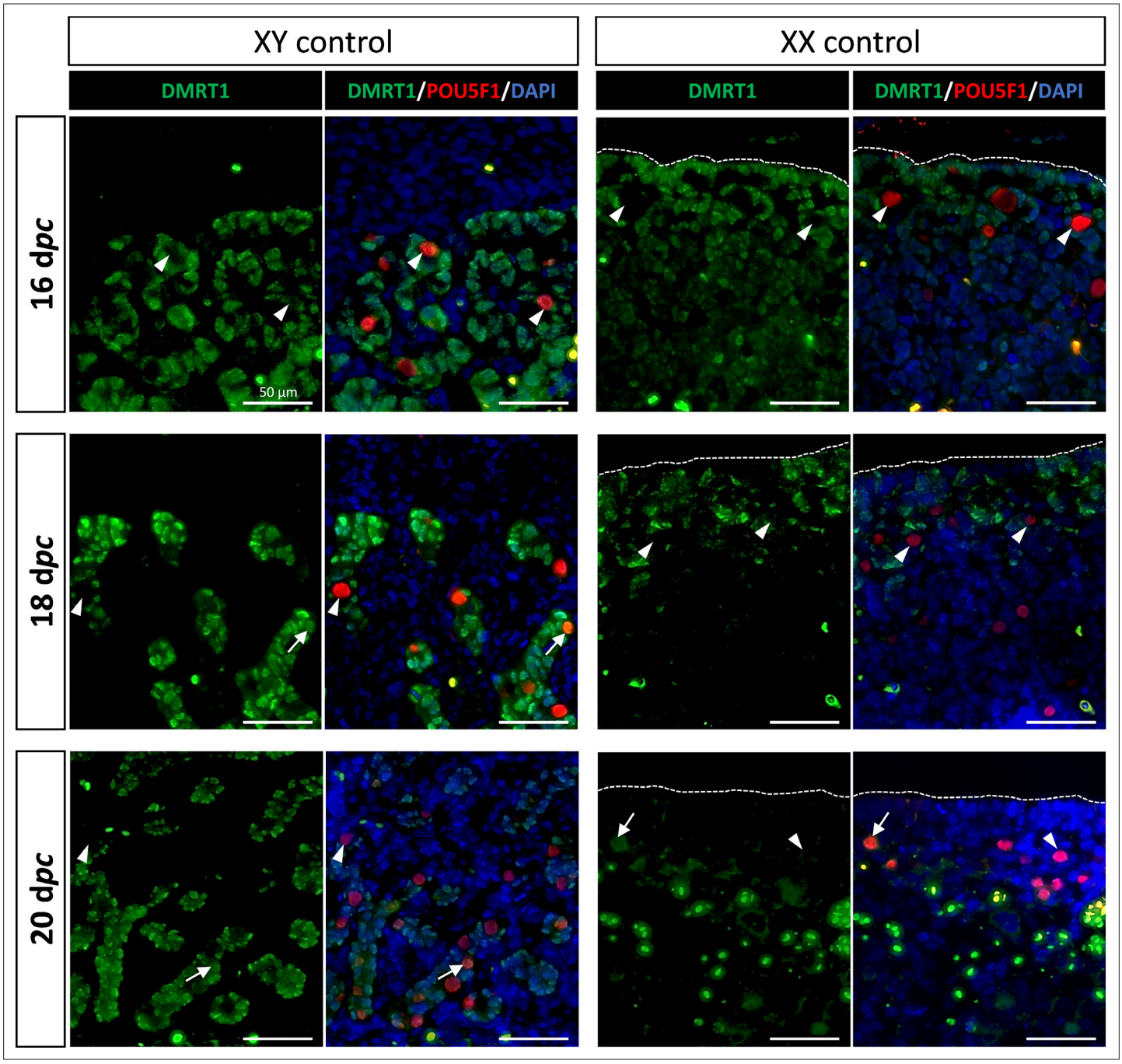


Figure 3—figure supplement 1. DMRT1 and POU5F1 co-detection in control gonads. DMRT1 (green) and POU5F1 (red) immunodetection in XY and XX control gonads from 16 to 20 *dpc*. Nuclei were stained in blue (DAPI). Arrowheads: cells expressing POU5F1 only. Arrows: cells co-expressing POU5F1 and DMRT1. Dotted line: delimitation of the ovarian surface epithelium. Dots with intense green labeling: auto-fluorescence of red blood cells. Scale bar = 50 µm.

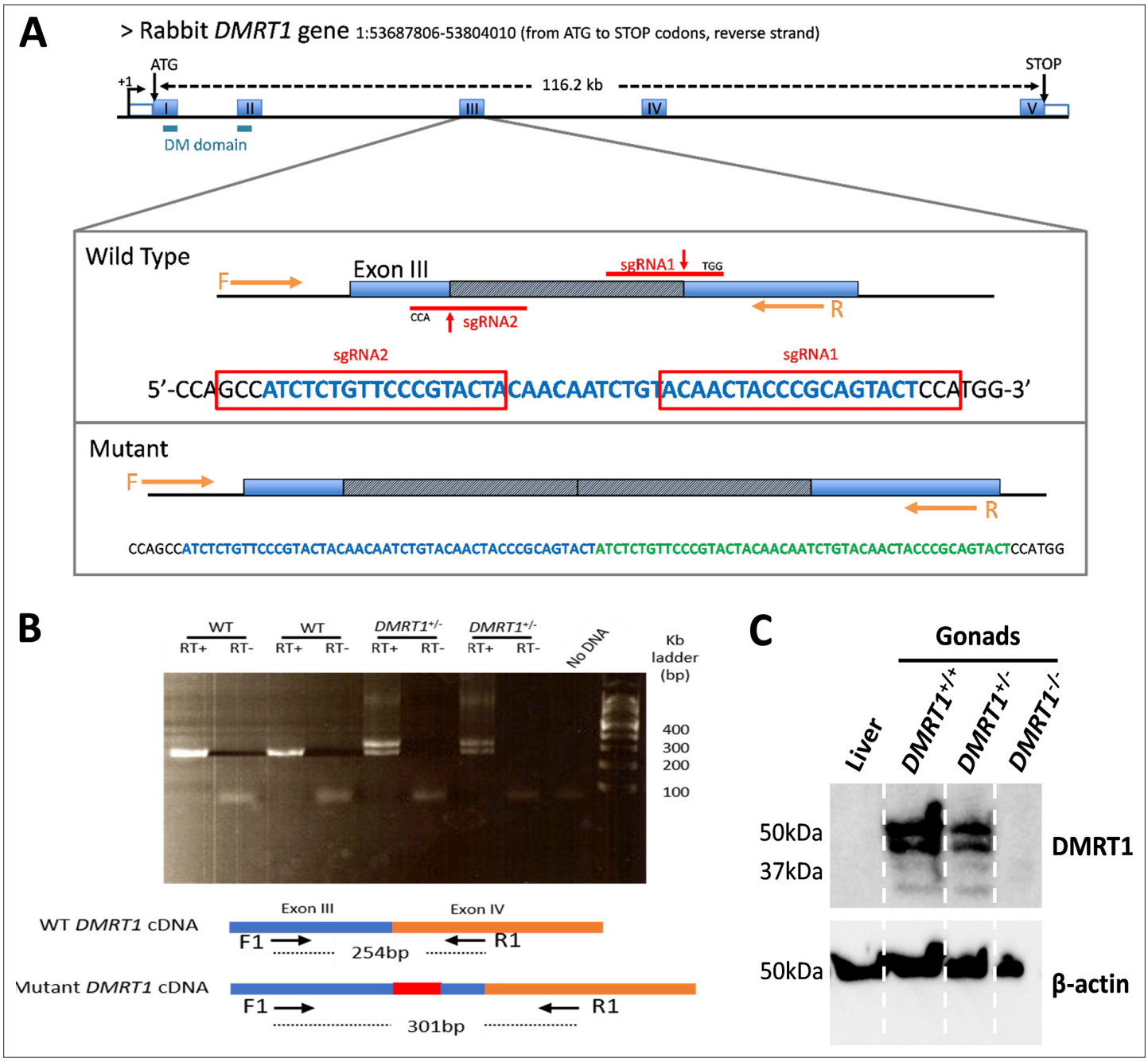


Figure 4—figure supplement 1. *DMRT1* mutation using CRISPR/Cas9 in rabbits. (**A**) Position of the two guides (sgRNA1 and sgRNA2) on the rabbit *DMRT1* transcript. Blue boxes represent the translated exons. The DM domain expands from exon I to exon II. The vertical red arrow indicates the Cas9-induced cleavage. The red box points to the sequence of the sgRNAs. The hatched box and bold blue letters point to the sequence between the theoretical and expected cleavage points. The cleaved fragment was inserted tandemly in the mutant allele at the cleavage site. Thus, by sequencing, a repeat was found (the repeats are written in blue and green bold letters). Consequently, the wild-type and the mutant allele were characterized through PCR using the F/R set of primers and gel electrophoresis. +1: putative transcription start site; ATG: site of initiation of translation; STOP: stop codon. (**B**) Total RNA were reverse transcribed (RT+), and the amplified products were analyzed through gel electrophoresis. A unique amplicon of 254 bp was observed in PCR products from wild-type rabbits and two (254 and 301 bp) in PCR products from heterozygous rabbits. RT−: reverse transcription control (no reverse transcriptase). (**C**) Western blot with nuclear proteins extracted from the liver of control rabbits and from 7 to 8 gonads of 1–3 d*pp* *DMRT1*$^{+/+}$, *DMRT1*$^{+/-}$, and *DMRT1*$^{-/-}$ rabbits.

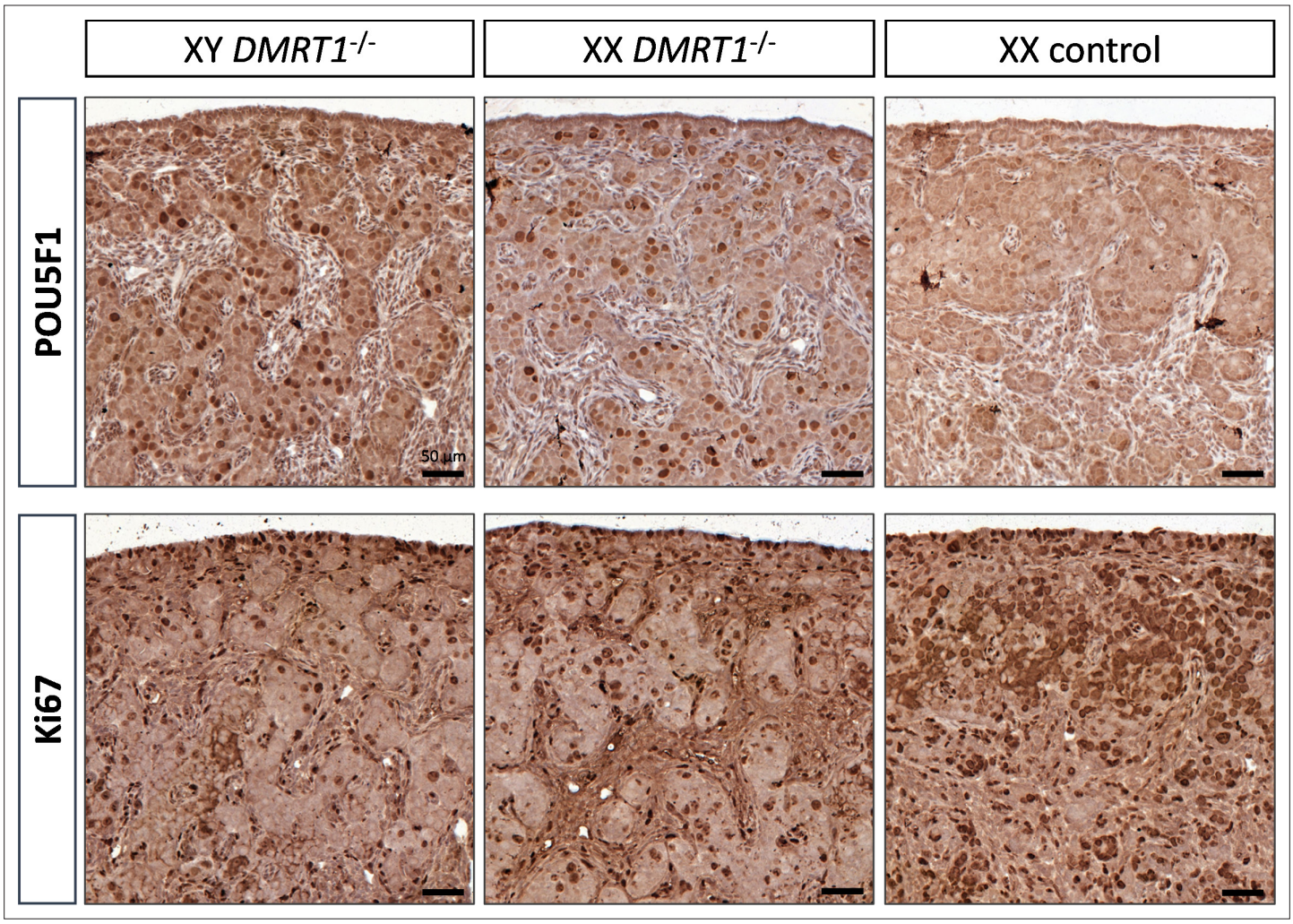


Figure 6—figure supplement 1. POU5F1 and Ki67 location on control and *DMRT1*$^{-/-}$ gonads at 3 d*pp*. Immunostaining of POU5F1 (pluripotency marker) and Ki67 (a marker of the exit of the G0 phase of the cell cycle) on gonad sections from XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$, and XX control at 3 d*pp*. Scale bar = 50 µm.

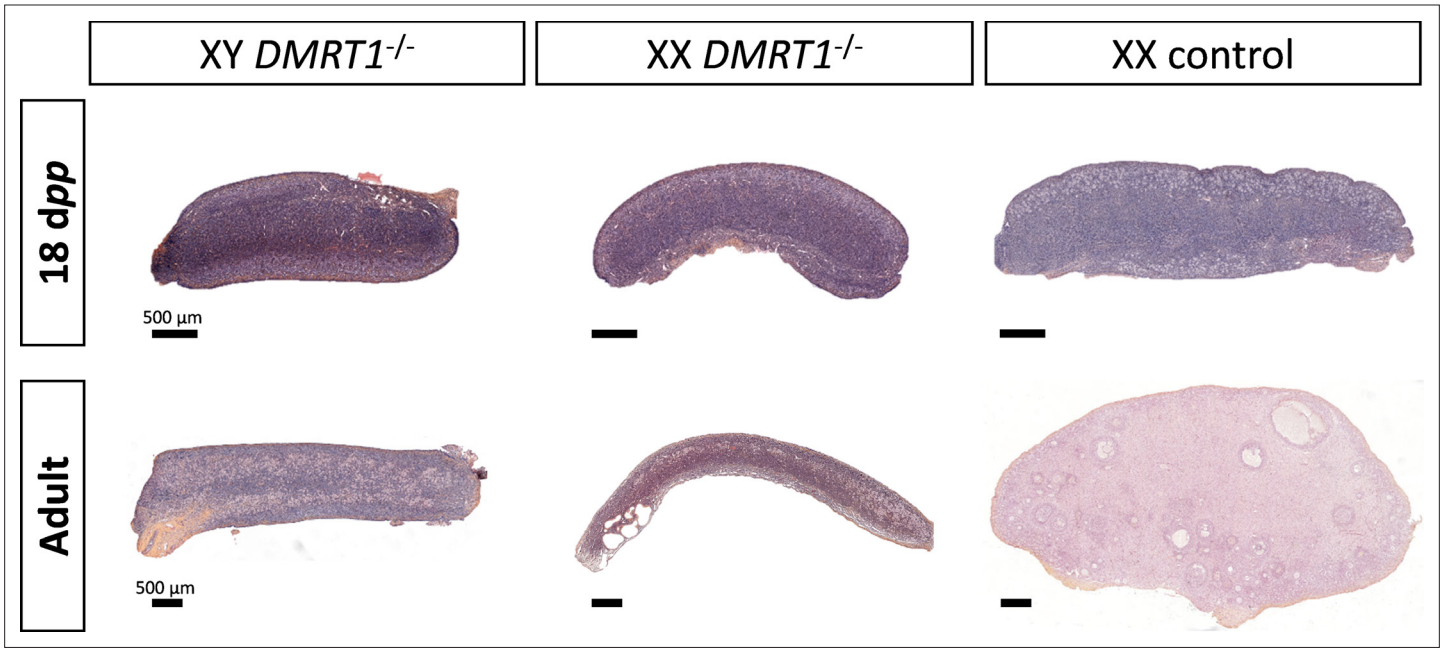


Figure 6—figure supplement 2. Evolution of gonadal size in XY and XX *DMRT1*$^{-/-}$ rabbits. Hematoxylin and eosin staining of gonad sections from XY and XX *DMRT1*$^{-/-}$ gonads and XX control ovaries at 18 d*pp*, and in adulthood (4–9 months). Scale bar = 500 µm.

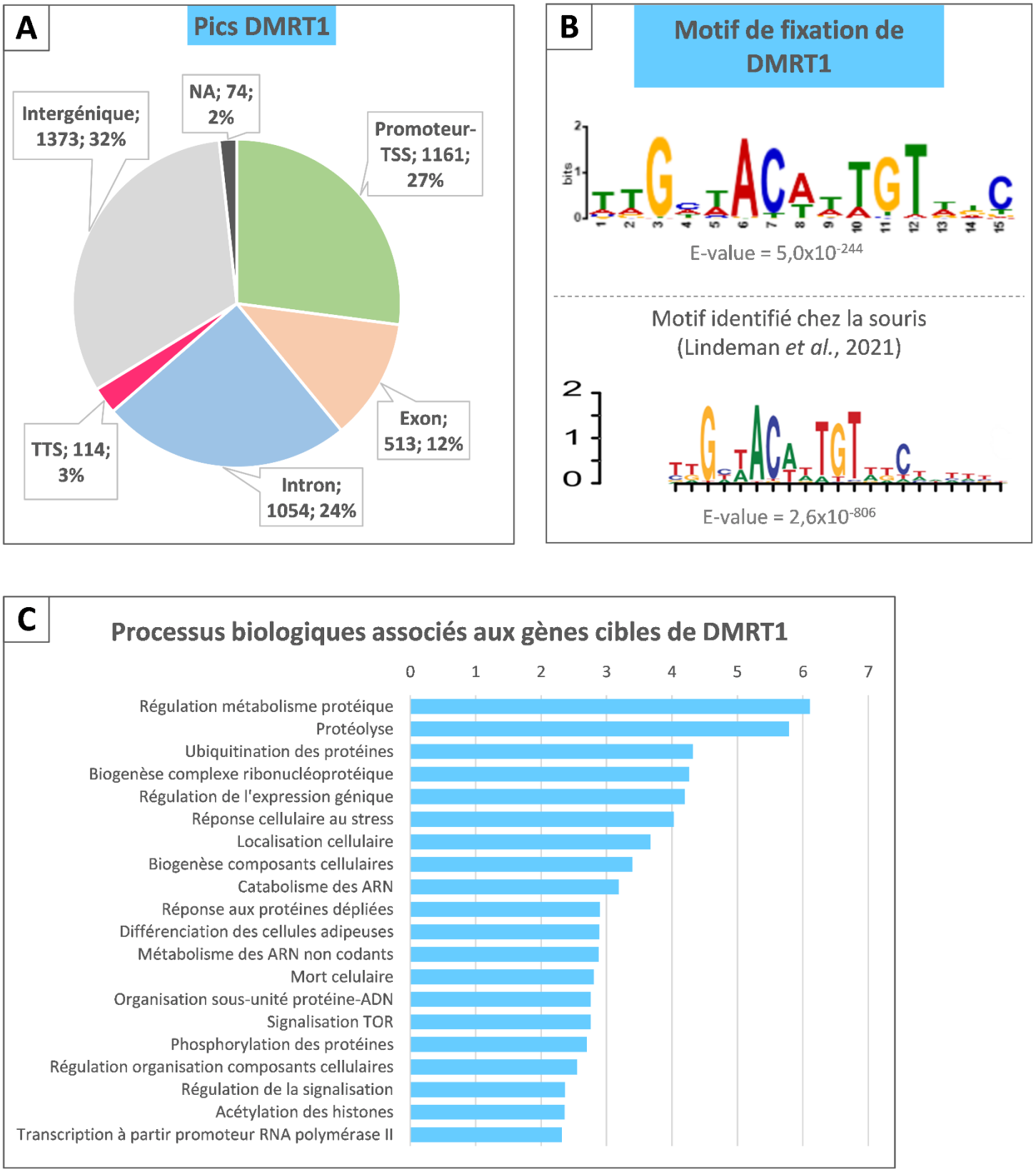
Résultats complémentaires et discussion

Les résultats publiés dans l'Article mettent en évidence l'importance de DMRT1 dans la différenciation testiculaire chez le lapin mais aussi dans la fertilité femelle. Ces premières analyses focalisées à 20 j*pc*, stade où DMRT1 est majoritairement exprimé dans les cellules germinales femelles ainsi que dans les cellules germinales et les cellules de Sertoli chez les mâles, ne nous permettaient pas de discerner un rôle dans les cellules somatiques chez les femelles. En effet, comme chez le mâle, *DMRT1* est exprimé dès 12 j*pc* et concerne la grande majorité des cellules somatiques femelles jusqu'à ce que l'expression de *FOXL2* débute vers 18 j*pc*. Des analyses complémentaires nous ont ainsi permis d'étudier le rôle de DMRT1 dans les cellules somatiques femelles au cours du développement ovarien précoce et de caractériser son rôle dans les cellules germinales au moment de la méiose. Pour cela, je m'appuierais sur trois ensembles de données.

Dans un premier temps, je vais vous présenter l'étude des cibles de DMRT1 chez le lapin grâce aux données de ChIP-sequencing (immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage) obtenues sur des gonades contrôles à 28 j*pc*. A ce stade, DMRT1 est présent à la fois dans les cellules de Sertoli et dans les cellules germinales dans le testicule alors qu'il n'est présent que dans les cellules germinales dans l'ovaire. Il aurait été préférable de se placer à un stade plus précoce mais un trop grand nombre de gonades était nécessaire pour cette expérience. Par ailleurs, en s'associant à un projet d'une autre équipe de l'unité BREED, nous avons pu récupérer une grande quantité de gonades à ce stade de 28 j*pc* nous permettant de faire deux immunoprécipitations par facteur de transcription d'intérêt et de faire deux cibles par sexe (DMRT1 et SOX9 dans le testicule, DMRT1 et FOXL2 dans l'ovaire).

Ensuite, je m'intéresserais au rôle de DMRT1 au cours de la différenciation ovarienne précoce avec des données de transcriptomique obtenues à 16 j*pc*, au moment où les gonades commencent à être sexuellement dimorphiques. De la même façon que pour la caractérisation à 20 j*pc*, un RNA-sequencing, des RT-qPCR ainsi que des analyses histologiques ont été réalisés.

Enfin, la caractérisation du blocage méiotique observé chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ a pu être poursuivie avec notamment l'analyse de données transcriptomiques obtenues à 1 j*pp*, au moment où la méiose s'initie. Des éléments du ChIP-sequencing seront aussi présentés dans ces deux parties lorsque des gènes clés ont été identifiés comme étant des cibles de DMRT1.



<u>Figure 32.</u> Répartition des pics, motif de fixation et processus biologiques associés aux cibles de DMRT1 dans le testicule.

(**A**) Distribution des pics de DMRT1 dans le testicule sur le génome de lapin. (**B**) Motif de fixation avec la valeur de E-value la plus faible identifié chez le lapin après analyse des données de ChIP-seq avec le logiciel MEME-ChIP (Motif Analysis of Large Nucleotide Datasets ; Machanick & Bailey, 2011). Le motif identifié chez la souris (à partir de cellules de Sertoli isolées à 7 *jpp*, Lindeman *et al.*, 2021) est identique à celui retrouvé chez le lapin. (**C**) Classement des vingt principaux processus biologiques associés aux gènes cibles de DMRT1 déterminés par analyse d'ontologie avec l'outil DAVID selon leur score d'enrichissement.

A) Détermination des cibles de DMRT1 chez le lapin à 28 j*pc*

Ces données ont pu être obtenues grâce à une collaboration avec Francis Poulat (Institut de Génétique Humaine, Montpellier) pour les aspects expérimentaux et les analyses ainsi qu'avec Stéphanie Le Gras (plateforme GenomEast, IGBMC, Strasbourg) pour l'analyse bio-informatique. La méthodologie utilisée est décrite dans **l'Annexe 3** de ce manuscrit.

Afin de comparer les cibles de DMRT1 à celles de deux autres gènes clés de la différenciation gonadique, des données de ChIP-sequencing ont également été obtenues pour SOX9 dans le testicule et pour FOXL2 dans l'ovaire.

1. Données de ChIP-seq DMRT1 dans le testicule

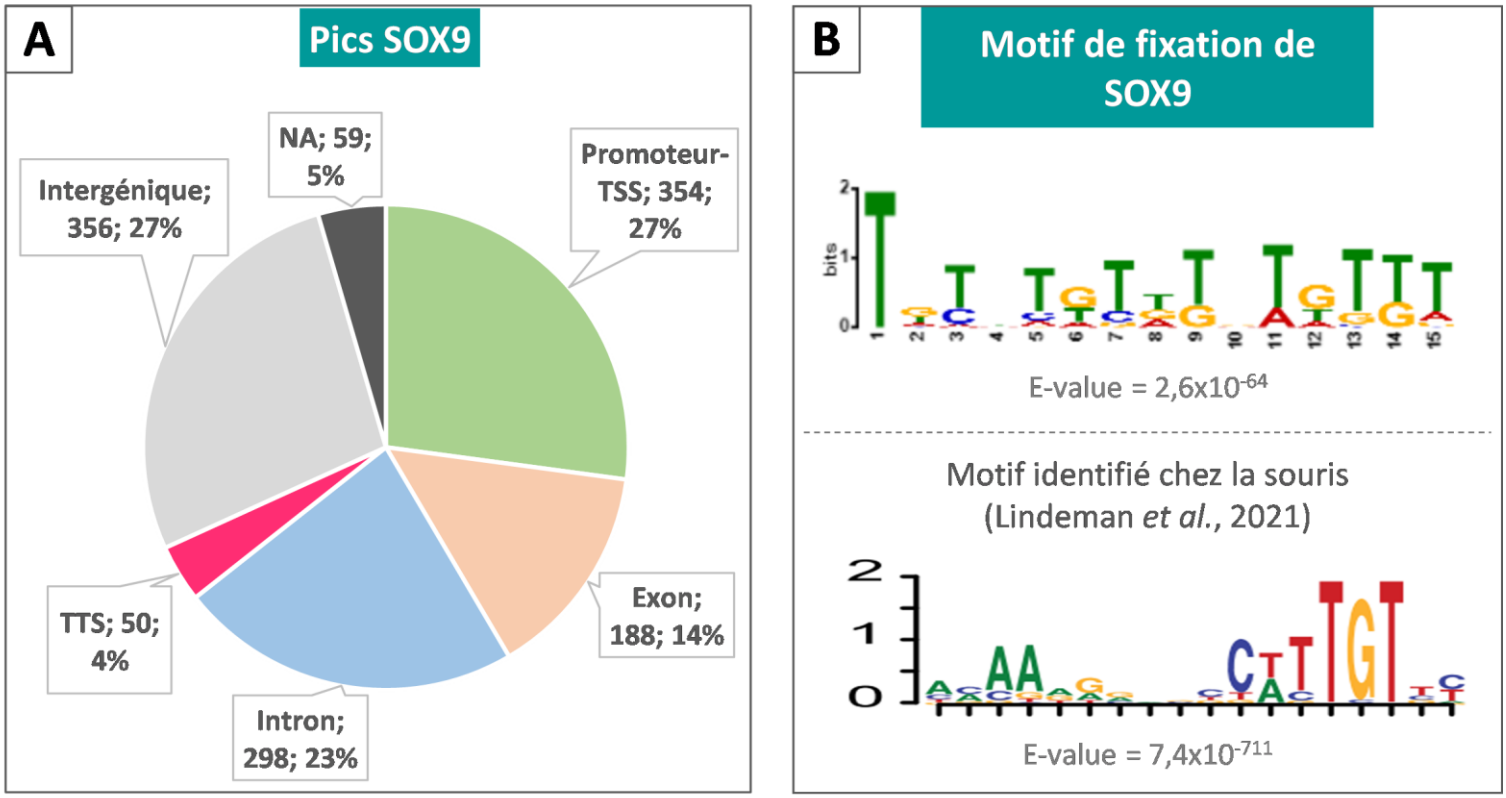
a. Distribution des pics sur le génome

A l'issue du « peak calling », seuls les pics reproductibles entre les deux immunoprécipitations (IPs) ont été pris en compte. Ensuite, l'annotation de ces pics a permis de déterminer leur position sur le génome de lapin (OryCun2.0). Ainsi, nous avions 4 289 pics pour DMRT1 dans le testicule. 27% de ces pics sont situés au niveau des promoteurs-TSS (Transcription Start Site), 12% sont dans les exons, 24% dans les introns, 3% au niveau des TTS (Transcription Terminal Site) et 32% dans les régions intergéniques. Enfin, les pics NA correspondent à des pics dans des régions non annotés du génome **(Figure 32A)**. Cette distribution semble indiquer que DMRT1 régule les gènes en se fixant au niveau de leur promoteur mais aussi au niveau de régions régulatrices de type enhancers, retrouvés dans les introns et les régions intergéniques (Pennacchio *et al*, 2013).

b. Analyse du motif de fixation

Ceci a été réalisé grâce au logiciel MEME-ChIP (Machanick & Bailey, 2011) et constitue en quelque sorte un élément de validation des données obtenues.

En **Figure 32B**, nous voyons ainsi que le motif de fixation pour DMRT1 dans le testicule le plus significatif (avec une E-value de $5{,}0 \times 10^{-244}$) est identique à celui décrit chez la souris à partir de données de ChIP-seq obtenues sur des cellules de Sertoli isolées de testicules à 7 j*pp* (Lindeman *et al*, 2021). Cette analyse nous permet ainsi de valider les données issues des IPs pour DMRT1 dans le testicule.



<u>Figure 33.</u> Répartition des pics et motif de fixation de SOX9 dans le testicule.
(**A**) Distribution des pics de SOX9 sur le génome de lapin. (**B**) Motif de fixation avec la valeur de E-value la plus faible identifié chez le lapin après analyse des données de ChIP-seq avec le logiciel MEME-ChIP (Machanick & Bailey, 2011). Le motif identifié chez la souris (à partir de cellules de Sertoli isolées à 7 *jpp*, Lindeman *et al.*, 2021) est totalement différent de celui retrouvé chez le lapin.

c. *Ontologie des gènes cibles de DMRT1 dans le testicule*

Cette analyse d'ontologie a été réalisée avec l'outil DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, https://david.ncifcrf.gov/) (Huang *et al*, 2009). Seuls les gènes associés aux pics retrouvés au niveau du promoteur/TSS, des exons, des introns et du TTS ont été considérés. Parmi les vingt principaux processus biologiques dans lesquels les cibles de DMRT1 sont associées, nous retrouvons divers termes liés à l'expression génique (acétylation des histones, transcription) et à des modifications protéiques (ubiquitination et phosphorylation). En plus d'être un régulateur transcriptionnel, DMRT1 régule des facteurs impliqués dans la régulation post-traductionnelle. De façon intéressante, DMRT1 a pour cibles des gènes impliqués dans la mort cellulaire et la régulation de la signalisation. Il peut ainsi moduler différentes voies de signalisation nécessaires au développement gonadique tout en contrôlant l'apoptose **(Figure 32C)**.

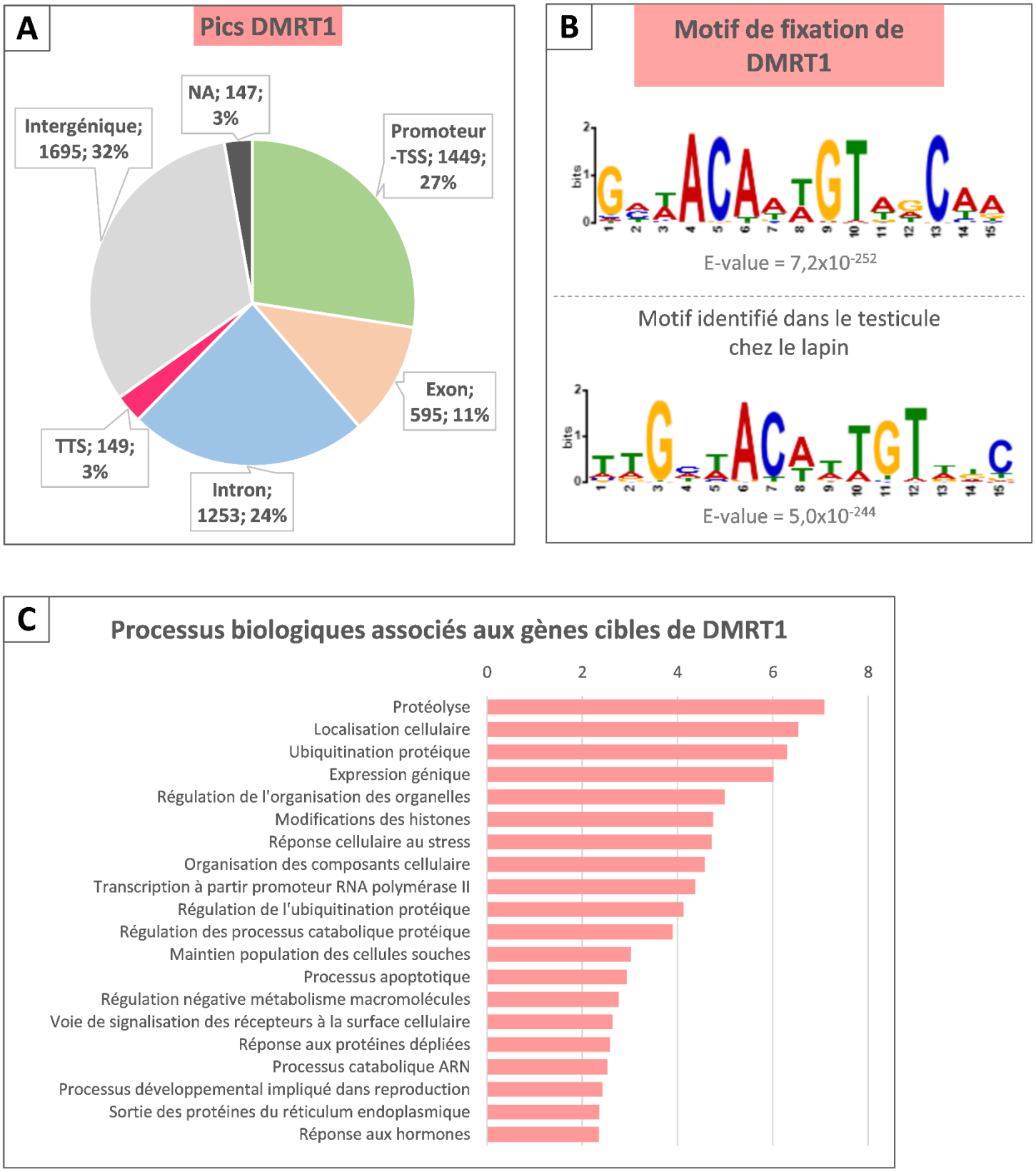
2. *Données de ChIP-seq SOX9 dans le testicule*

a. *Distribution des pics sur le génome*

Contrairement à DMRT1, très peu de pics ont été identifiés dans le testicule pour SOX9 puisque seuls 1 305 pics ont été retrouvés. Ces pics présentent néanmoins une distribution similaire à celle retrouvée pour DMRT1 avec 27% au niveau des promoteurs-TSS, 14% dans les exons, 23% dans les introns, 4% dans les TTS et 27% dans les régions intergéniques **(Figure 33A).**

b. *Analyse du motif de fixation*

Alors que cette analyse nous a permis de valider les données obtenues pour DMRT1, ce n'est malheureusement pas le cas pour SOX9. Sur les 11 motifs détectés, aucun n'est similaire à un motif connu pour SOX9 (Lindeman *et al*, 2021), ni même à celui d'autres gènes de la famille SOX. Le motif le plus significatif (E-value de $2{,}6 \times 10^{-64}$; **Figure 33B**) est en effet proche de ceux décrits pour BCL11B (B-Cell Lymphoma/Leukemia 11B), RREB1 (Ras Responsive Element Binding Protein 1) ou STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription 2). Du fait du faible nombre de pics reproductibles entre les deux IPs, nous avons voulu recommencer cette analyse en considérant chaque IP de façon indépendante. Une



<u>Figure 34.</u> Répartition des pics, motif de fixation et processus biologiques associés aux cibles de DMRT1 dans l'ovaire.

(**A**) Distribution des pics de DMRT1 dans l'ovaire sur le génome de lapin. (**B**) Motif de fixation avec la valeur de E-value la plus faible identifié chez le lapin après analyse des données de ChIP-seq avec le logiciel MEME-ChIP (Machanick & Bailey, 2011). Le motif identifié dans le testicule chez le lapin est similaire à celui retrouvé dans l'ovaire. (**C**) Classement des vingt principaux processus biologiques associés aux gènes cibles de DMRT1 déterminés par analyse d'ontologie avec l'outil DAVID selon leur score d'enrichissement.

nouvelle fois, cela n'a pas permis de retrouver un motif similaire à ceux décrits chez la souris. Par ailleurs, aucun pic n'a pu être observé au niveau de *l'AMH* ou de *DHH*, deux cibles bien connues de SOX9 (Rahmoun *et al*, 2017). Ainsi, les données pour SOX9 ont été considérées comme aberrantes et n'ont pas été étudiées de façon plus approfondie.

Le fait que cette immunoprécipitation ne nous donne pas de résultats convaincants peut s'expliquer par une fixation non appropriée au début du protocole. En effet, de précédents travaux avaient utilisé une double fixation (disuccinimidyl glutarate puis formaldéhyde) pour du ChIP-sequencing SOX9 sur gonades (Rahmoun *et al*, 2017; Lindeman *et al*, 2021). Or, pour nos expériences chez le lapin, seule une fixation au formaldéhyde a été réalisée. Alors qu'en cellules isolées, une seule fixation peut suffire (Lindeman *et al*, 2021), à partir de gonades entières, la double fixation est certainement nécessaire pour les expériences de ChIP-seq SOX9.

3. Données de ChIP-seq DMRT1 dans l'ovaire

a. Distribution des pics sur le génome

Dans l'ovaire, 5 288 pics pour DMRT1 ont pu être identifiés, soit plus de 1 000 pics supplémentaires par rapport au testicule. Ceci semble être en cohérence avec le statut de différenciation des gonades à 28 j*pc*. Alors que dans le testicule, les cellules de Sertoli sont différenciées et que les cellules germinales vont progressivement entrer en quiescence, dans l'ovaire, les cellules germinales se préparent à entrer en méiose. La distribution de ces pics est très proche de celle observée dans le testicule. Ainsi, 27% des pics sont retrouvés dans les promoteurs-TSS, 11% dans les exons, 24% dans les introns ainsi que 3% dans les TTS et 32% dans les régions intergéniques **(Figure 34A)**. Que ce soit dans l'ovaire ou dans le testicule, DMRT1 peut se fixer au niveau des enhancers et des promoteurs.

b. Analyse du motif de fixation

Dans l'ovaire, DMRT1 se fixe majoritairement (E-value de $7{,}2 \times 10^{-252}$) sur un motif identique à celui retrouvé dans le testicule, validant aussi ces données. Sur les 15 bases identifiées, il y a en effet juste un décalage de 2 bases mais les 9 bases majoritaires (le G en position 1, le TACA en positions 3 à 6, le TGT en positions 8 à 10 et le C en position 13) sont communes au motif retrouvé dans le testicule **(Figure 34B)**. Ce décalage peut apparaitre comme

<u>Figure 35.</u> Répartition des pics, motif de fixation et processus biologiques associés aux cibles de FOXL2 dans l'ovaire.

(**A**) Distribution des pics de FOXL2 sur le génome de lapin. (**B**) Motif de fixation avec la valeur de E-value la plus faible identifié chez le lapin après analyse des données de ChIP-seq avec le logiciel MEME-ChIP (Machanick & Bailey, 2011). Le motif identifié chez la souris (à partir de ovaires fœtaux à 14.5 *jpc* (Nicol *et al.*, 2018) ou de cellules folliculaires isolées d'ovaires à 8 semaines (Georges *et al.*, 2014)) est similaire à celui retrouvé chez le lapin. (**C**) Classement des vingt principaux processus biologiques associés aux gènes cibles de FOXL2 déterminés par analyse d'ontologie avec l'outil DAVID selon leur score d'enrichissement.

étant nécessaire à une fixation différente en fonction du type cellulaire puisqu'à ce stade, DMRT1 n'est retrouvé que dans les cellules germinales dans l'ovaire.

c. Ontologie des gènes cibles de DMRT1 dans l'ovaire

De la même façon que dans le testicule, les gènes cibles de DMRT1 sont impliqués dans l'expression génique, l'ubiquitination des protéines, l'apoptose, la réponse au stress cellulaire ou encore la signalisation cellulaire à partir de récepteurs. Nous retrouvons également des termes qui n'étaient pas présents dans les vingt principaux processus biologiques dans le testicule. Dans l'ovaire, DMRT1 régule ainsi des gènes impliqués dans le maintien de la population des cellules souches et dans le processus développemental associé à la reproduction. Du fait que les cellules germinales femelles à ce stade de 28 j*pc* sortent rapidement du statut pluripotent (ovogonies), nous pouvons penser que c'est plutôt un rôle inhibiteur de DMRT1 sur l'expression de ces gènes contrôlant l'état « souche ». En parallèle, il régule aussi des gènes associés au processus développemental impliqué dans la reproduction et donc dans la génération de gamètes. Par ailleurs, des cibles de DMRT1 sont aussi impliqués dans la réponse aux hormones **(Figure 34C)**.

4. Données de ChIP-seq FOXL2 dans l'ovaire

a. Distribution des pics sur le génome

Un très grand nombre de pics ont été identifiés pour FOXL2 par rapport à DMRT1 puisque 12 090 pics ont été mis en évidence. Leur distribution est également différente de celle déterminée pour DMRT1 puisque la majorité des pics est retrouvée dans les régions intergéniques (44%) et au niveau des introns (39%). Alors que le pourcentage de pics au niveau des TTS est très proche de celui déterminé pour DMRT1 (2%), seuls 10% des pics sont dans les promoteurs-TSS (contre 27% pour DMRT1) et 4% dans les exons **(Figure 35A)**. Cela suggère que FOXL2 régule majoritairement l'expression de gènes en se fixant au niveau des régions enhancers plutôt qu'en passant par une fixation au niveau des promoteurs.

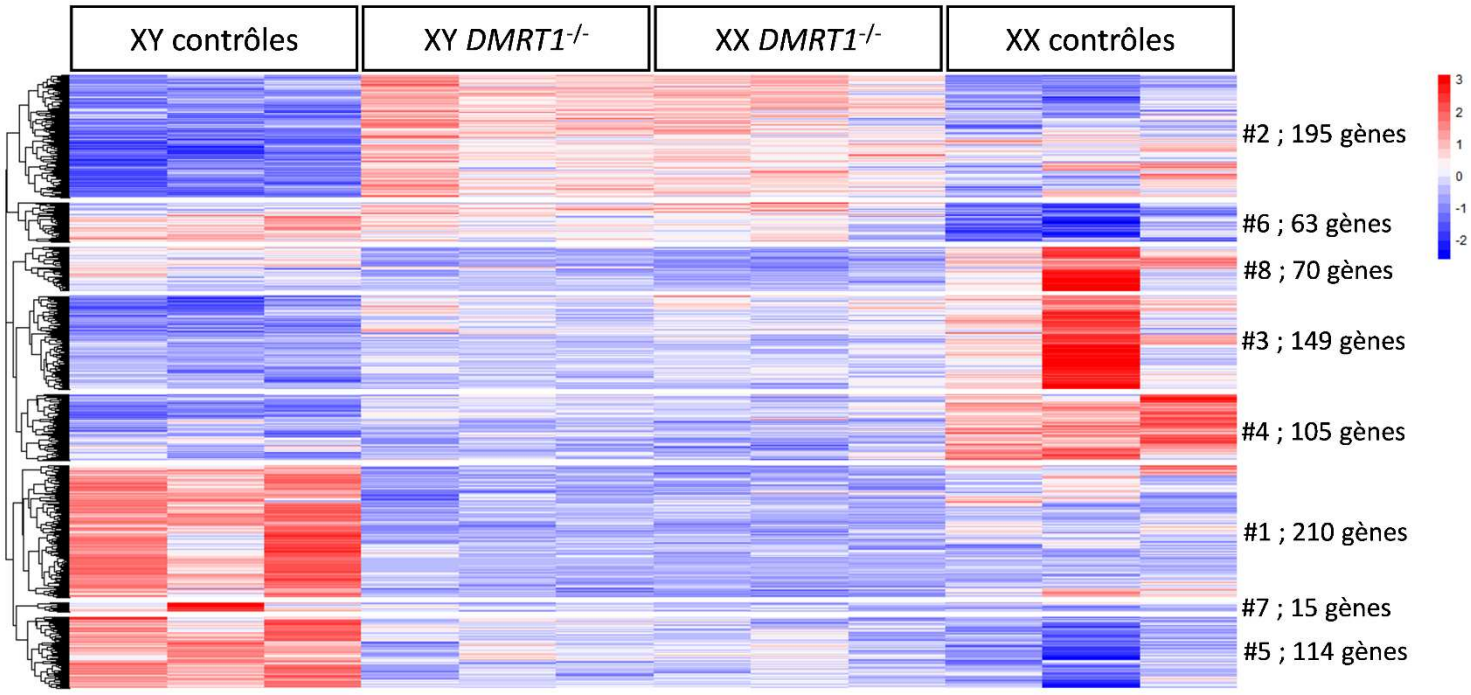
b. Analyse du motif de fixation

Le motif de fixation pour FOXL2 le plus souvent retrouvé (E-value de $4{,}0 \times 10^{-554}$) est similaire à celui décrit chez la souris à partir d'ovaires collectés à 14.5 j*pc* (Nicol *et al*, 2018) ou de cellules folliculaires isolées d'ovaires de souris de 8 semaines (Georges *et al*, 2014). En effet, il y a juste les bases en positions 9 et 10 chez le lapin qui sont des A plutôt que des T chez la souris. Sinon, les autres bases sont identiques **(Figure 35B)**. Ainsi, les données de ChIP-seq pour FOXL2 sont également validées.

c. Ontologie des gènes cibles de FOXL2 dans l'ovaire

Le processus biologique le plus important dans lequel les gènes cibles de FOXL2 sont impliqués correspond à la régulation de la transduction du signal. FOXL2 aurait donc un rôle prépondérant dans la signalisation intracellulaire et les différentes voies de signalisation impliquées dans le développement ovarien. FOXL2 a également pour cibles des gènes associés à trois processus clé de la différenciation d'un ovaire à savoir la réponse aux facteurs de croissance, la réponse aux hormones et surtout la voie β-caténine canonique. Dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, j'ai pu souligner l'importance de la coopération entre FOXL2 et la voie RSPO1/WNT4/β-caténine dans la mise en place d'un ovaire fonctionnel. Il apparait aussi que FOXL2 cible des gènes impliqués dans le développement, la prolifération et la croissance cellulaire, qui sont des processus cruciaux au cours du développement gonadique. Finalement, nous retrouvons aussi des processus biologiques communs avec DMRT1 tels que la régulation de l'expression génique, l'ubiquitination protéique ou encore la mort cellulaire **(Figure 35C)**. De façon intéressante, plusieurs de ces processus biologiques ont aussi été mis en évidence chez la souris à partir de données de ChIP-sequencing FOXL2 (Georges *et al*, 2014; Nicol *et al*, 2018) confortant une fois de plus nos données.

En conclusion, nous avons donc des résultats probants pour DMRT1 et FOXL2 non seulement au niveau de leur motif de fixation mais aussi au niveau des processus biologiques dans lesquels leurs gènes cibles sont impliqués. Je reviendrais sur certaines des cibles clés dans les deux prochaines parties.



<u>Figure 36.</u> Signature transcriptomique spécifique aux gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*.
Représentation en heatmap des 921 gènes dérégulés (*p*-value ajustée <0.05 et |log2FC|>1) entre les XY contrôles, les XY *DMRT1*$^{-/-}$, les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et les XX contrôles à 16 j*pc*.

B) Caractérisation des gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*

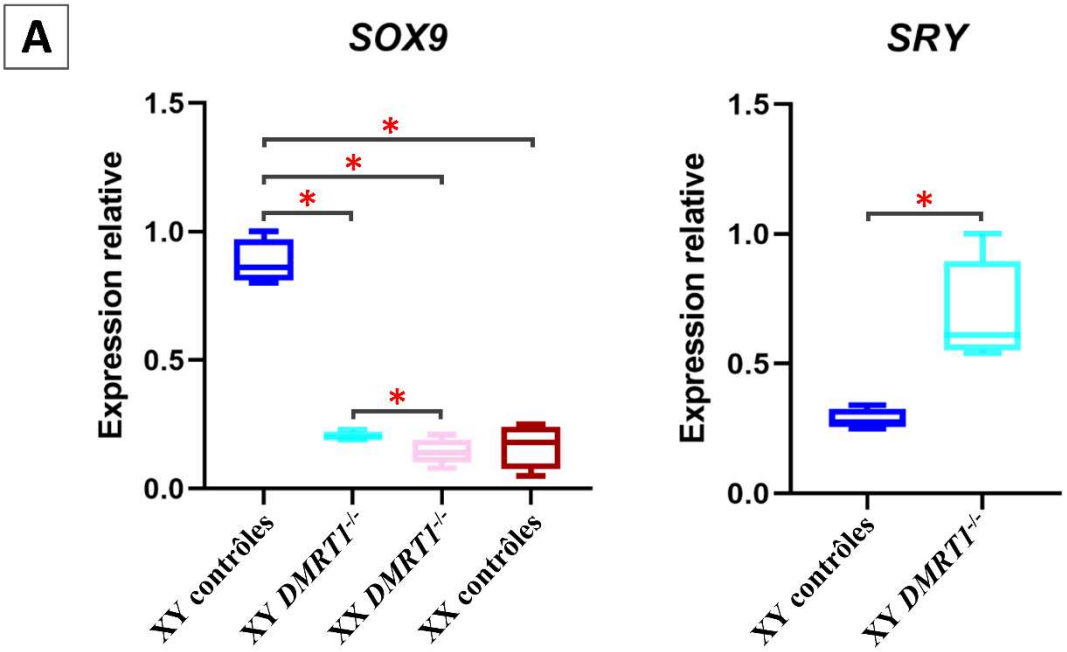
Afin d'étudier l'effet de la perte de DMRT1 à un stade du développement gonadique précoce, j'ai réalisé de nouvelles analyses à 16 j*pc*, stade où chez les contrôles, DMRT1 n'est présent que dans les cellules somatiques des deux sexes. De façon inattendue, nous allons voir qu'à ce stade, les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ et XX *DMRT1*$^{-/-}$ ont un statut de différenciation particulier.

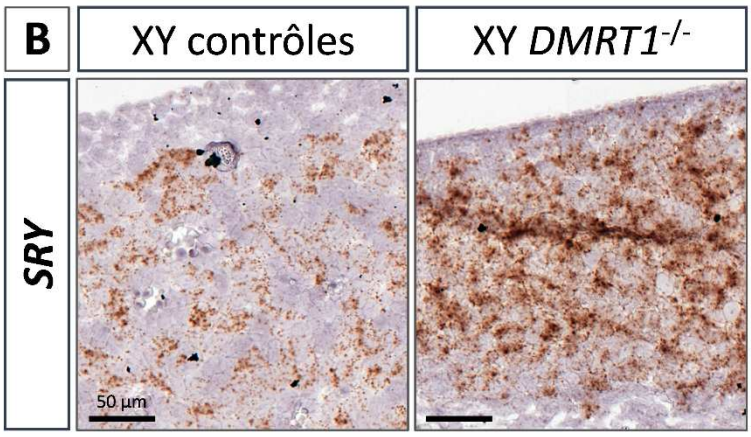
1. Profil transcriptomique obtenu par RNA-sequencing sur gonades entières

Comme pour les données obtenues à 20 j*pc*, le RNA-sequencing a été réalisé sur trois individus de chaque génotype (XY contrôles, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX contrôles et XX *DMRT1*$^{-/-}$). La représentation en heatmap des 921 gènes avec une expression différentielle dans au moins un des génotypes (*p*-value ajustée <0.05 et |log2FC|>1) a été séparée en huit clusters **(Figure 36)**. Ainsi, nous voyons qu'à 16 j*pc*, les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ et XX *DMRT1*$^{-/-}$ sont très similaires d'un point de vue transcriptionnel. L'analyse d'expression différentielle avec l'outil DESeq2 (Love *et al*, 2014) entre ces deux génotypes montre qu'il n'y a qu'un seul gène (*EIF2S3*, Eucaryotic translation Initiation Factor 2 subunit gamma) avec une expression différentielle. De façon intéressante, les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ sont déjà très différentes des XY contrôles avec une expression diminuée des gènes spécifiquement exprimés dans les testicules à ce stade (clusters #1, #5 et #7). Alors qu'à 20 j*pc* les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ (XY et XX) sont très proches des XX contrôles **(Figure 4B de l'Article)**, à 16 j*pc*, nous pouvons voir qu'elles sont différentes. En effet, elles n'expriment pas encore les gènes exprimés dans les ovaires (clusters #3 et #4) mais expriment plus fortement un ensemble de gènes par rapport aux gonades contrôles XY et XX (cluster #2). Les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ des deux sexes (XY et XX) expriment en revanche 63 gènes qui sont aussi retrouvés chez les XY contrôles (cluster #6) mais elles n'expriment pas ceux du cluster #8 qui sont exprimés par les gonades XY et XX contrôles.

a. L'inversion sexuelle des XY DMRT1$^{-/-}$ *est précoce*

La représentation en heatmap nous montre que dès 16 j*pc*, stade où les cordons testiculaires commencent à se former au sein de testicules contrôles, les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ ne s'engagent pas vers la voie de différenciation testiculaire **(Figure 36)**. En analyse DESeq2,



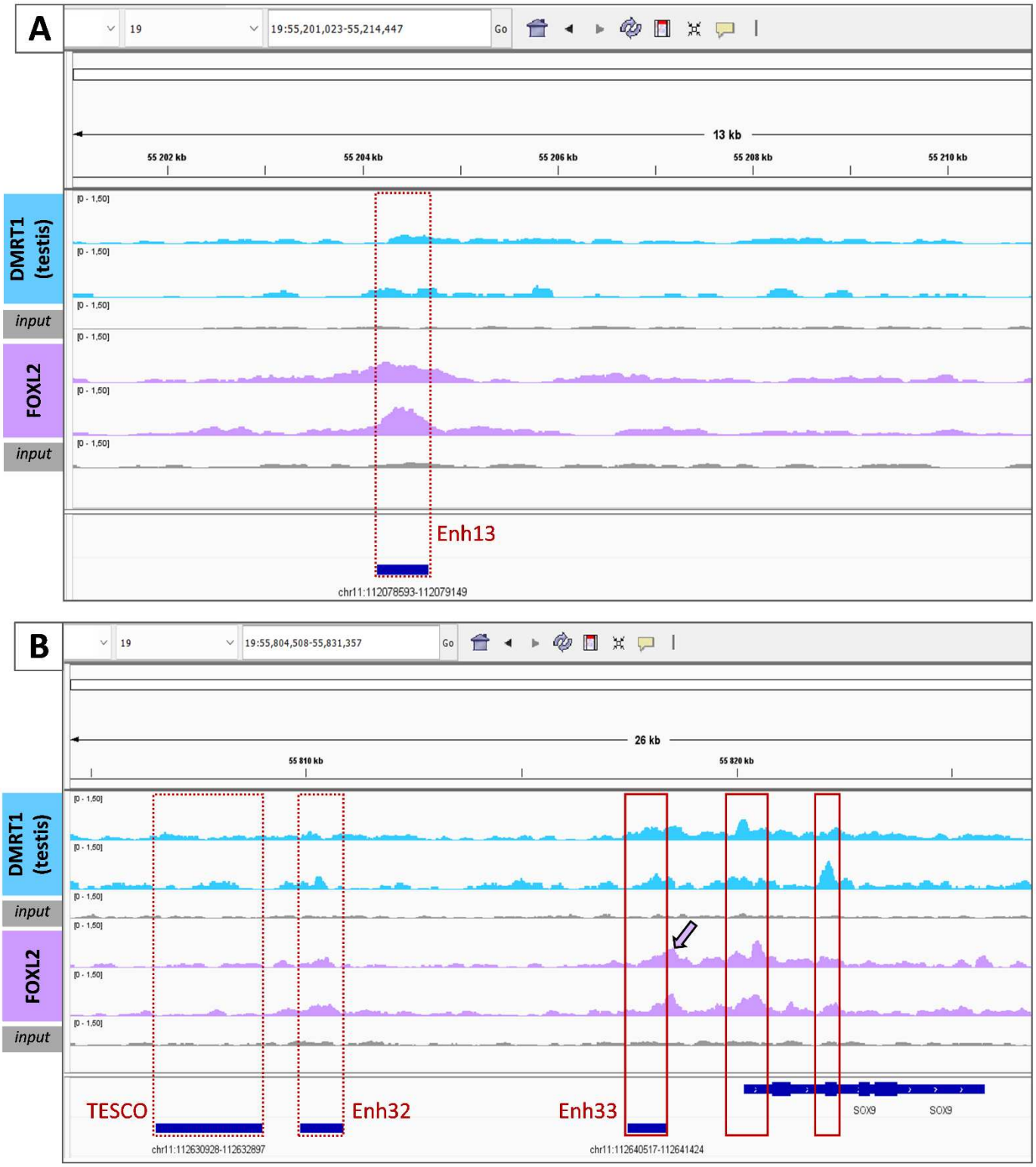


<u>Figure 37.</u> Expression de *SOX9* et *SRY* dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*.
(**A**) Analyses en RT-qPCR de l'expression de *SOX9* et *SRY* à partir de gonades XY contrôles (n=4), XY *DMRT1*$^{-/-}$ (n=5), XX *DMRT1*$^{-/-}$ (n=7) et XX contrôles (n=5) à 16 j*pc*. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de permutations. * : *p*-value < 0.05. (**B**) Hybridation *in situ* (technologie RNAscope) de *SRY* sur des coupes de gonades XY contrôles et XY *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*. Barre d'échelle = 50 µm.

la comparaison des XY contrôles aux XY *DMRT1*$^{-/-}$ souligne un grand nombre de gènes avec une expression différentielle (avec une *p*-value inférieure à 0.05). Parmi les 330 gènes avec une expression diminuée chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$ nous retrouvons des gènes clés de la différenciation testiculaire tels que *DKK1* (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1), *INHBB*, *PTCH1*, *SOX9*, *AMH* et *DHH*. A l'inverse, les 284 gènes surexprimés chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$ comprennent des gènes du développement ovarien tels que *WNT4*, *ESR1*, *CYP19A1*, *AXIN2* et *RUNX1* (RUNX family transcription factor 1). L'analyse DAVID sur ces 284 gènes met ainsi en évidence des termes tels que le processus développemental impliqué dans la reproduction, la voie des récepteurs à la surface cellulaire ainsi que le processus métabolique des hormones. Ces trois termes sont cohérents avec le développement ovarien qui fait appel à la voie de signalisation WNT/β-caténine et au cours duquel des hormones stéroïdes, telles que les œstrogènes, seront rapidement synthétisées.

Les gènes présentant une expression réduite chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$ se retrouvent ainsi dans les clusters #1, #5 et #7 de la heatmap. La vérification en RT-qPCR de l'expression de *SOX9* sur un plus grand nombre de gonades confirme l'absence d'induction de son expression chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$ **(Figure 37A)**. Ces résultats sont identiques à ce que nous avions observé à 20 j*pc*. Et de la même façon, l'expression de *SRY* est déjà significativement plus forte chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$ que chez les XY contrôles dès 16 j*pc* **(Figure 37A)**. En hybridation *in situ*, cela se traduit par un marquage très intense sur les coupes de gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ **(Figure 37B)**. Ainsi, en l'absence de DMRT1, SRY n'induit pas une expression suffisante de *SOX9* permettant la différenciation testiculaire. L'augmentation de l'expression de *SRY* dans les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ peut être la cause de la faible expression de *SOX9* comme cela a pu être rapporté chez la souris (Chaboissier *et al*, 2004; Gonen *et al*, 2017, 2018). Ainsi, après avoir atteint un niveau suffisant, SOX9 exercerait un rétro-contrôle négatif sur SRY dont l'expression testiculaire disparait très rapidement chez la souris (Koopman *et al*, 1990; Sinclair *et al*, 1990).

Cette absence d'initiation de l'expression de *SOX9*, crucial et suffisant à la différenciation testiculaire (Vidal *et al*, 2001; Chaboissier *et al*, 2004; Barrionuevo *et al*, 2006), est à l'origine de la dérégulation des gènes en aval et donc de l'inversion sexuelle chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$. L'implication de DMRT1 dans la détermination testiculaire passe donc par la régulation de *SOX9*. Après l'identification de l'Enhancer 13 en 2018 et la mise en évidence de la présence d'éléments de fixation pour DMRT1 dans cette séquence chez le lapin (Gonen *et al*, 2018), nous avons émis l'hypothèse d'une fixation de DMRT1 sur l'Enhancer 13 afin de réguler positivement *SOX9*. C'est notamment pour vérifier cette hypothèse que nous avons voulu réaliser des expériences de ChIP avec un anticorps anti-DMRT1.



<u>Figure 38.</u> Visualisation des données de ChIP-seq au niveau de différentes régions en amont du gène *SOX9*.

(**A**) Région du génome de lapin homologue à l'Enh13, élément de régulation critique de l'expression de *Sox9* chez la souris (Gonen *et al.*, 2018). (**B**) Région juste en amont de *SOX9* avec des zones homologues à l'élément TESCO, ainsi qu'aux Enh32 et Enh33 identifiés par Gonen *et al.* en 2018. Les images correspondent à des captures lors de la visualisation des données avec le logiciel IGV. Les rectangles rouges encadrent les régions étudiées. La flèche représente le pic pour FOXL2 dans l'ovaire identifié lors de l'annotation comme un « vrai » pic c'est-à-dire reproductible entre les deux IPs. Les régions chromosomiques indiquées en bas des images correspondent au génome murin (MGSCv37/mm9).

Par une recherche d'homologie entre la séquence de l'Enh13 chez la souris et le génome de lapin, nous avons pu trouver des bases identiques et localiser cet élément. Ainsi, 79 et 37 bases présentent 86% et 97% d'homologie sur le chromosome 19 de lapin (OryCun2.0) aux coordonnées 55,204,194-55,204,272 et 55,204,526-55,204,562 respectivement. L'utilisation de l'outil en ligne « Lift Genome Annotations » (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver) a permis de convertir les coordonnées de l'Enh13 de souris sur le génome du lapin. Ainsi, la zone correspondante chez le lapin se trouve sur le chromosome 19 (coordonnées : 55,204,138-55,204,668), à 616 kb en amont du TSS du gène *SOX9* et comprend bien les fragments homologues décrits ci-dessus. La visualisation des données de ChIP-seq sur le logiciel IGV (Integrative Genomic Viewer) (Robinson *et al*, 2011) au niveau de cette zone est présentée en **Figure 38A**. Nous observons ainsi un pic pour FOXL2 au niveau de l'Enh13 suggérant qu'il se fixe au niveau de cet élément de régulation clé afin d'empêcher l'expression de *SOX9* au sein des cellules de la granulosa et/ou de leurs précurseurs. Ceci est différent de ce qui est décrit chez la souris, puisque dans l'ovaire, FOXL2 semble se fixer sur l'Enh8 (Nicol *et al*, 2018). En revanche, nous n'observons pas vraiment de pic très net et reproductible entre les deux IPs pour DMRT1 au niveau de cet Enh13, même si une faible fixation semble être détectée au niveau de cette région sur chacune des IPs. Ces données ne nous permettent pas de confirmer notre hypothèse selon laquelle DMRT1 se fixerait sur l'Enh13 afin de réguler l'expression de *SOX9*. Néanmoins, nous ne pouvons pas non plus infirmer cette hypothèse puisqu'au stade où le ChIP-seq a été réalisé, l'expression de SOX9 est initiée depuis 14 jours. Par ailleurs, à 28 j*pc*, DMRT1 étant aussi exprimé dans les cellules germinales, cela peut masquer le signal et empêcher de voir un pic au niveau de cette région. Il est aussi possible que la régulation du maintien de son expression utilise un autre élément régulateur.

Ainsi, pour essayer de mettre en évidence une zone de fixation de DMRT1 en amont de SOX9, j'ai ensuite étudié tous les enhancers décrits dans l'article de Gonen (figure S1) (Gonen *et al*, 2018). De la même façon que pour les coordonnées de l'Enh13, j'ai utilisé l'outil « Lift Genome Annotations » pour obtenir les coordonnées de chaque enhancers sur le génome du lapin. Parmi les 33 enhancers, 7 n'ont pas pu être convertis (Enh11, Enh16, Enh17, Enh20, Enh21, Enh24 et Enh25). J'ai donc pu étudier sur IGV les données ChIP-seq au niveau de 26 régions ayant une correspondance sur le génome de lapin. Le seul endroit où il y a un pic, plus fort que celui du bruit de fond mesuré par l'input, dans au moins une des deux IPs est l'Enh33 (55,817,454-55,818,373) situé à 2,7 kb en amont de *SOX9*. Au niveau de cette zone, il semble en effet y avoir une fixation de DMRT1 dans le testicule et de FOXL2 dans l'ovaire **(Figure**

38B). En amont de cette zone, le TESCO et l'Enh32 ne présentent pas vraiment de fixation pour DMRT1 ou FOXL2. En revanche, dans le testicule, DMRT1 semble aussi se fixer dans la région du promoteur et dans le deuxième exon de *SOX9*. Dans l'ovaire, FOXL2 présente aussi un pic au niveau du promoteur **(Figure 38B)**.

L'Enh33, le promoteur et le deuxième exon de *SOX9* ont ensuite été ciblés pour validation en ChIP-qPCR. Il fallait pour cela, dans un premier temps, obtenir des amorces capables d'amplifier ces zones. Ainsi, trois couples d'amorces ont été désignés pour chaque zone mais aucun n'a permis l'obtention de paramètres acceptables validant leur utilisation en qPCR. Ces amorces ayant été désignées à partir des séquences issues d'Ensembl, nous avons voulu vérifier que ces séquences étaient identiques chez les lapins de notre animalerie. De nouvelles amorces amplifiant des fragments plus larges ont été désignées et une nouvelle fois, leur efficacité s'est avérée relativement faible. Un couple a toutefois permis d'amplifier une partie de l'Enh33. Le séquençage du produit PCR obtenu a révélé, chez nos lapins, une séquence identique à celle issue de Ensembl. Nous en sommes restés là pour le moment, il n'y a pas eu d'autres essais de design d'amorces pour cette vérification en ChIP-qPCR.

Je me suis enfin intéressée aux trois enhancers décrits chez l'humain (Croft *et al*, 2018). De la même façon que pour les coordonnées des enhancers souris, j'ai passé les coordonnées de eSR-A, eSR-B et eSR-ALDI sur « Lift Genome Annotations » pour obtenir la région homologue du génome de lapin.

La recherche d'homologie de séquence a permis de retrouver des fragments similaires entre humain et lapin dans les régions converties pour eSR-A (chr19:55,203,160-55,204, 965 à 617 kb en amont de *SOX9*) et eSR-ALDI (chr19:55,803,589-55,804,851 à 16 kb en amont de *SOX9*). La visualisation des données de ChIP-seq au niveau de ces zones sur IGV révèle que, chez le lapin, eSR-A se trouve juste avant l'Enh13 et présente un pic pour FOXL2. En revanche, aucun pic n'est identifié au niveau de eSR-ALDI.

Pour ce qui est de eSR-B, dont les coordonnées converties sur le génome de lapin sont à 550 kb en amont de *SOX9* (chr19:55,269,472-55,269,88), la seule homologie identifiée sur le génome de lapin est retrouvée au niveau du chromosome 14. Néanmoins, lors de l'annotation des données de ChIP-seq, un pic pour DMRT1 dans le testicule a pu être identifié à 560 kb en amont de *SOX9* (chr19:55,259,470-55,259,765). Du fait que eSR-B ne corresponde qu'à une partie de la région RevSex identifiée en 2011 et dont la duplication est associée à des 46, XX DSD avec dysgénésie gonadique complète (Benko *et al*, 2011), je me suis intéressée à la région dans sa totalité. Ainsi, la conversion des coordonnées du génome humain sur le génome lapin

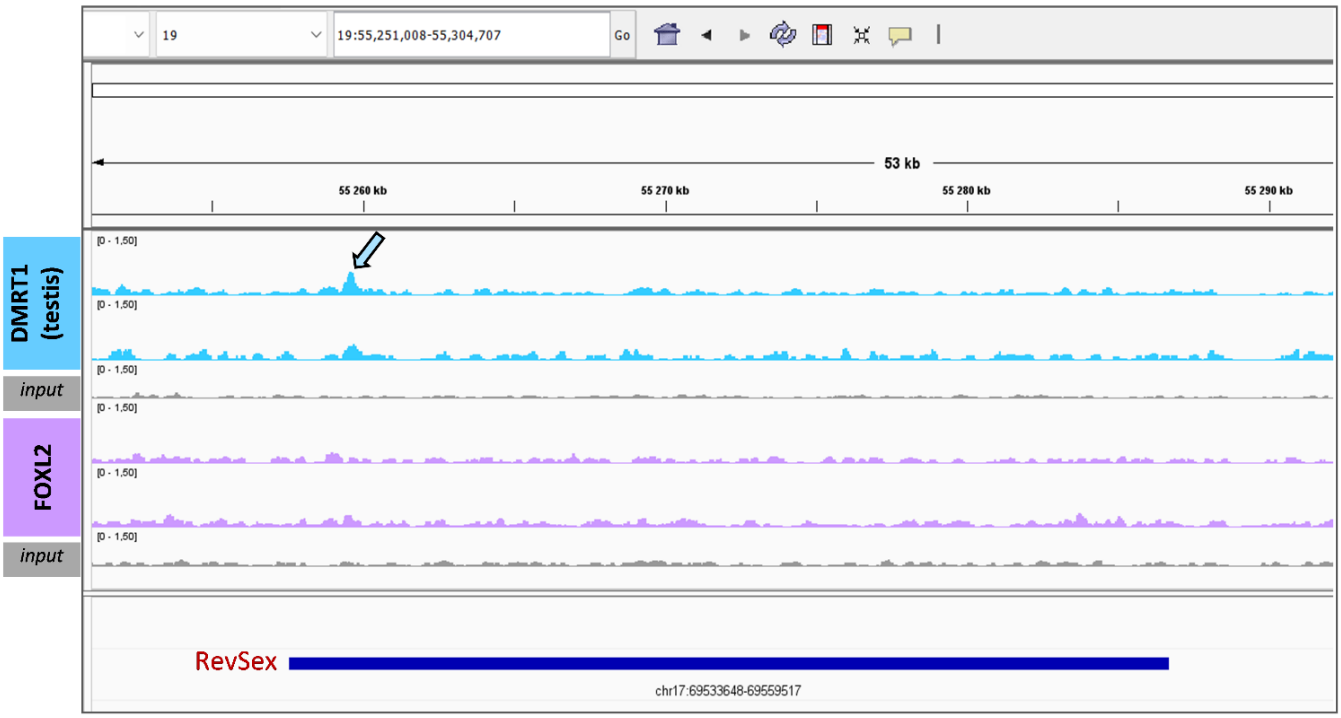


Figure 39. Fixation de DMRT1 au niveau de la région RevSex à 562 kb en amont du gène *SOX9*. Région du génome de lapin homologue à la région RevSex dont la duplication est associée chez l'humain à des DSD (Benko *et al*., 2011). L'image correspond à une capture lors de la visualisation des données avec le logiciel IGV. La flèche représente le pic pour DMRT1 dans le testicule identifié lors de l'annotation comme un « vrai » pic c'est-à-dire reproductible entre les deux IPs. La région chromosomique indiquée en bas de l'image correspond au génome humain (GRCh37/hg19).

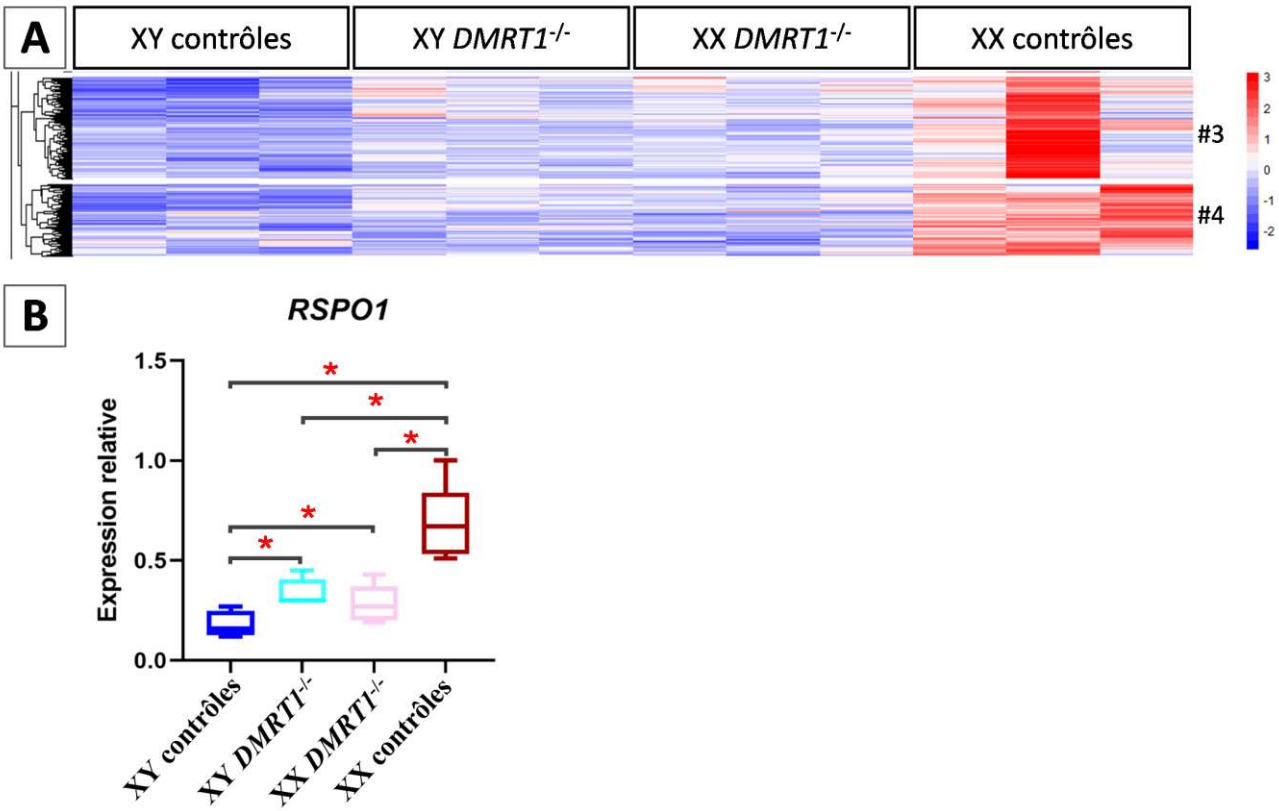


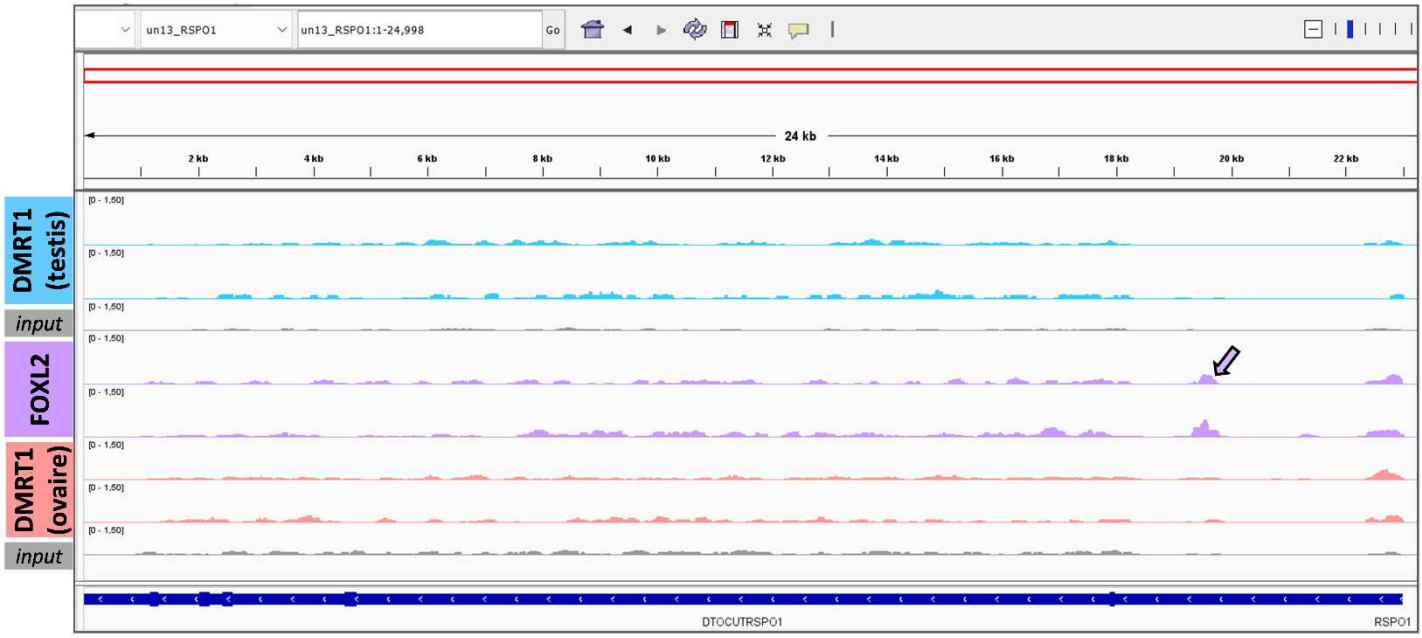
Figure 40. Expression de *RSPO1* dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 *jpc*.
(**A**) Clusters #3 et #4 de la heatmap représentant 254 gènes dérégulés sur les 921 gènes au total (*p*-value ajustée <0.05 et |log2FC|>1) entre les XY contrôles, les XY *DMRT1*$^{-/-}$, les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et les XX contrôles à 16 *jpc*. (**B**) Analyses en RT-qPCR de l'expression de *RSPO1* à partir de gonades XY contrôles (n=4), XY *DMRT1*$^{-/-}$ (n=5), XX *DMRT1*$^{-/-}$ (n=7) et XX contrôles (n=5) à 16 *jpc*. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de permutations. * : *p*-value < 0.05.

indique que cette région RevSex se trouve sur le chromosome 19 entre les positions 55,257,540 et 55,286,672 à 562 kb en amont de *SOX9*. La visualisation de cette zone sur IGV révèle bien le pic de DMRT1 dans le testicule au niveau de cette région RevSex **(Figure 39)**. En plus d'une potentielle régulation au niveau du promoteur et du deuxième exon, DMRT1 pourrait réguler l'expression de *SOX9* en se liant aussi sur la région RevSex. Cela doit encore être confirmé par un ChIP-qPCR avec des amorces ciblant spécifiquement cette zone. D'autant plus que, chez l'humain, quatre sites de fixation de DMRT1 ont pu être prédits dans cette région RevSex (Hyon *et al*, 2015). La conversion des coordonnées de ces quatre sites sur le génome lapin n'a permis de retrouver que l'un d'entre eux sur le chromosome 19 aux coordonnées 55,281,881-55,281,899. Bien que le pic identifié dans le ChIP-sequencing DMRT1 ne tombe pas dans cette zone, les données chez l'humain et nos données chez le lapin suggèrent une régulation de l'expression de *SOX9* par DMRT1 *via* cette région RevSex.

Avec ces données de RNA-seq à 16 j*pc*, nous confirmons que l'inversion du sexe chez les lapins XY en l'absence de DMRT1 se fait dès le début de la différenciation gonadique. En effet, les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ ne s'engagent jamais dans la voie de différenciation testiculaire. Ce rôle clé de DMRT1 passe par la régulation de l'expression de *SOX9* en se fixant potentiellement au niveau du promoteur et d'une région située à 560 kb en amont du gène *SOX9*.

b. La différenciation ovarienne est retardée chez les XX DMRT1$^{-/-}$

Comme évoqué au début de cette partie, la heatmap montre que les gènes fortement exprimés dans les gonades XX contrôles (clusters #3 et #4) ne sont pas encore exprimés dans les gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$ ni dans les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ **(Figure 40A)**. Dans ces deux clusters, nous retrouvons des gènes clés du développement ovarien tels que *FOXL2*, *RSPO1* et *FST*. L'analyse DESeq2 entre les XX contrôles et les XX *DMRT1*$^{-/-}$ met en évidence que 332 gènes ont une expression dérégulée. Les 223 gènes avec une expression réduite chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ comprennent notamment *RSPO1* et *WNT5B* (WNT family member 5B) alors que *DMRT1*, *DMRT3* et *LHX9* font partis des 99 gènes surexprimés chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$. L'analyse ontologique avec l'outil DAVID souligne que les gènes dont l'expression est diminuée sont associés à deux processus biologiques impliqués dans le développement ovarien : la réponse aux cytokines et la régulation de la signalisation. Cela confirme qu'à 16 j*pc*, les gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$ n'expriment pas correctement les gènes clés permettant la mise en place des processus cellulaires nécessaires au développement ovarien.



<u>Figure 41.</u> Visualisation des données de ChIP-seq au niveau du gène *RSPO1*.
Capture du logiciel IGV représentant les données de ChIP-seq au niveau de *RSPO1*. La flèche représente le pic pour FOXL2 dans l'ovaire identifié lors de l'annotation comme un « vrai » pic c'est-à-dire reproductible entre les deux IPs.

Je me suis ensuite focalisée sur le gène *RSPO1* et la voie WNT4/β-caténine puisqu'à 20 j*pc*, nous avions souligné un profil d'expression intéressant pour *RSPO1* **(Figure 5B de l'Article)**. Ainsi, à 16 j*pc*, *RSPO1* présente déjà une expression sexuellement dimorphique puisqu'il est significativement plus important chez les XX contrôles par rapport aux XY contrôles. De façon intéressante, les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ et XX *DMRT1*$^{-/-}$ ont une expression significativement plus importante que chez les XY contrôles mais cette expression est aussi plus faible que chez les XX contrôles **(Figure 40B)**. Comme à 20 j*pc*, DMRT1 semble avoir un rôle direct sur l'expression de *RSPO1*. Du fait de son importance cruciale dans la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique dans les gonades précoces des deux sexes (Chassot *et al*, 2012), la différenciation ovarienne (Chassot *et al*, 2008) et la méiose des cellules germinales femelles (Chassot *et al*, 2011; Le Rolle *et al*, 2021), cette perturbation de *RSPO1* peut entrainer diverses conséquences. Dans les gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$, l'une de ces conséquences pourrait correspondre au retard de la différenciation ovarienne. DMRT1 joue donc un rôle aussi dans la différenciation de l'ovaire précoce, probablement *via* une régulation directe de l'expression de *RSPO1*. Les données de ChIP-seq nous ont permis de vérifier cela.

J'ai ainsi commencé par étudier les données de ChIP-seq au niveau de *RSPO1* sur IGV. Le génome de lapin n'étant pas complétement annoté, *RSPO1* fait partie des gènes pour lesquels l'annotation de la séquence intra-génique a été ajoutée manuellement au laboratoire. C'est pourquoi il est nommé « DTOCUTRSPO1 ». Nous observons ainsi un petit pic pour FOXL2 et pour DMRT1 dans l'ovaire au niveau du début de la séquence du gène. De plus, un autre pic est présent pour FOXL2 avant le premier intron et celui-ci a pu être identifié comme un vrai pic, reproductible entre les deux IPs **(Figure 41)**. Ces données suggèrent donc une relation entre DMRT1, RSPO1 et FOXL2 au cours de la différenciation ovarienne. Par ailleurs, il est important de souligner que nous avons ajouté dans le génome de lapin que la séquence intra-génique du gène *RSPO1*. Nous ne sommes donc pas en mesure de regarder si DMRT1 présente ou non une fixation en amont ou en aval du gène dans les régions inter-géniques adjacentes.

Chez le lapin, plusieurs éléments soulignent donc un lien entre RSPO1 et DMRT1 dans les cellules somatiques ovariennes. En effet, *RSPO1* commence à être exprimé dès 14 j*pc*, soit 48 heures après DMRT1, et bien avant FOXL2 qui n'est détecté qu'à partir de 18 j*pc*. Nous avons aussi souligné que le marquage pour *RSPO1* en hybridation *in situ* est retrouvé dans une zone de l'ovaire où DMRT1 est également présent alors que FOXL2 n'y est pas **(Figure 3C de l'Article**). Nos données de ChIP-seq ne nous permettent pas de confirmer la relation entre RSPO1 et DMRT1 dans les cellules somatiques puisqu'au stade où elles ont été obtenues,

<u>Tableau 2.</u> Composants de la voie WNT/β-caténine identifiés comme cibles de DMRT1 ou de FOXL2.

Récapitulatif des différents acteurs de la voie WNT/β-caténine ciblés par DMRT1 dans l'ovaire ou dans le testicule ou par FOXL2 dans l'ovaire. Pour chaque gène, la position du pic associé est indiquée.

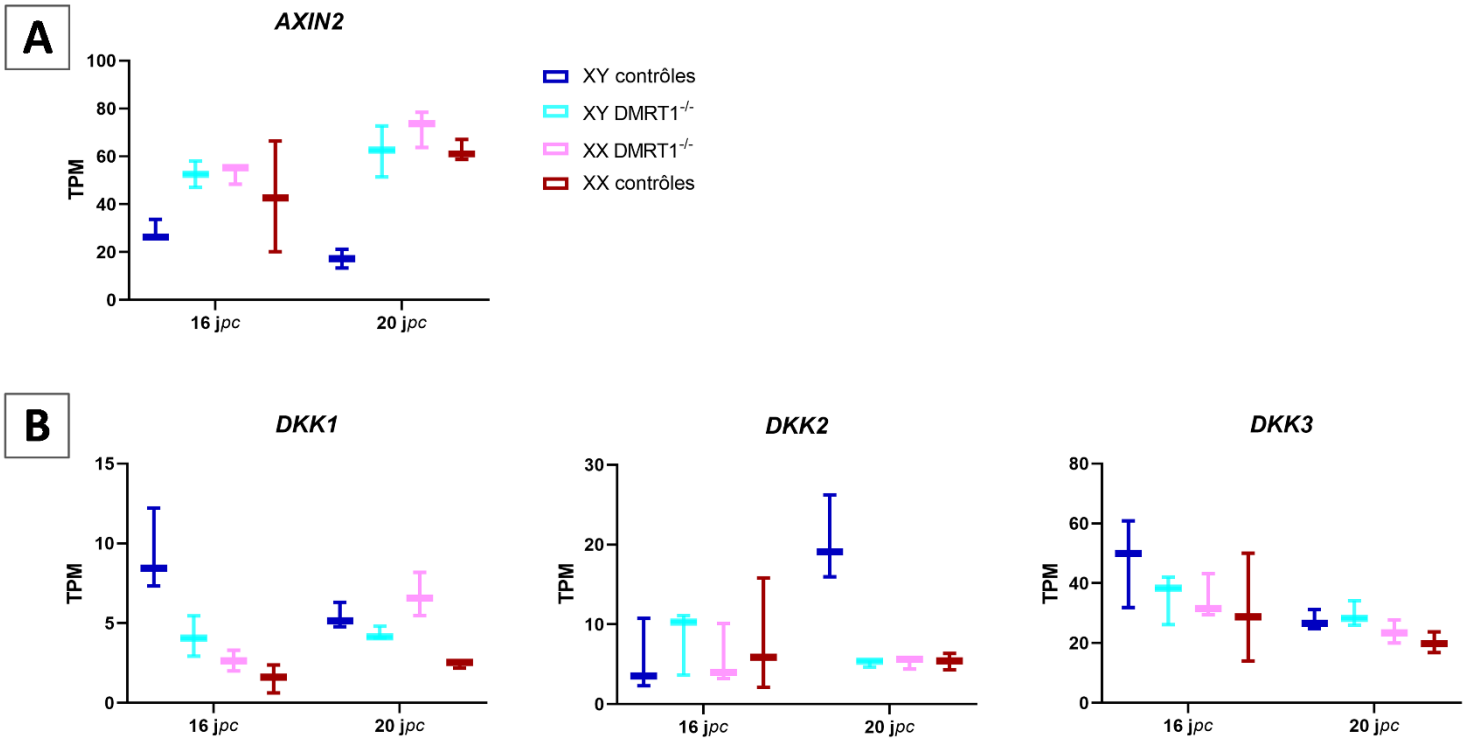
Composants de la voie WNT		DMRT1 (ovaire)	FOXL2	DMRT1 (testicule)
Récepteurs	*FZD1*			promoteur/TSS
	FZD4		intron	
	FZD5			promoteur/TSS
	FZD9			exon
	LRP6		intron	
	LGR4	promoteur/TSS		promoteur/TSS
Ligands	*WNT2B*	promoteur/TSS		
	WNT5A	exon	intron	intron
Molécules intracellulaires	*DVL2*			TTS
	LEF1	exon	exon, intron	
	GSK3B	promoteur/TSS, exon, intron	intron	
	AXIN2	intron	intron	
	CTNNB1		promoteur/TSS	
	APC	promoteur/TSS		
Régula-teurs négatifs	*DKK1*		intron	
	DKK2			exon
	DKK3		intron	

DMRT1 n'est exprimé que dans les cellules germinales. Néanmoins, nous pouvons imaginer que, dans l'ovaire de lapin, DMRT1 est à l'origine de l'expression de *RSPO1* dans les cellules somatiques ovariennes. Ceci pourrait favoriser leur prolifération au début du développement ovarien. Une fois exprimé, FOXL2 agirait comme inhibiteur de *RSPO1* pour permettre la différenciation des cellules de la granulosa.

Chez la souris, une fixation de FOXL2 est également observée en aval de *Rspo1* (Nicol *et al*, 2018). Bien que les auteurs aient attribué ce pic au gène *Gnl2* (G protein Nucleolar 2), dont le TSS est plus proche, la régulation de *Rspo1* par FOXL2 est à envisager chez cette espèce puisque son expression est augmentée dans les gonades *Foxl2*$^{-/-}$ (Garcia-Ortiz *et al*, 2009). Au contraire, chez la chèvre, l'expression de *RSPO1* est drastiquement réduite dans les gonades XX *FOXL2*$^{-/-}$ ou PIS$^{-/-}$ (Boulanger *et al*, 2014; Elzaiat *et al*, 2014) alors qu'ils apparaissent être exprimés dans des types cellulaires différents (Kocer *et al*, 2008). Nos données sont donc en accord avec les observations chez la chèvre en ce qui concerne l'expression de RSPO1 et FOXL2 dans des types cellulaires différents. Du point de vue de la régulation de l'expression de *RSPO1*, nos données se rapprochent de ce qui est observé chez la souris.

Dans les cellules de Sertoli en période post-natale, une fixation de DMRT1 a aussi pu être mise en évidence au niveau du gène *Rspo1* chez la souris (Matson *et al*, 2011). Cette interaction semble donc plutôt associée à une inhibition de *Rspo1* par DMRT1 dans le testicule.

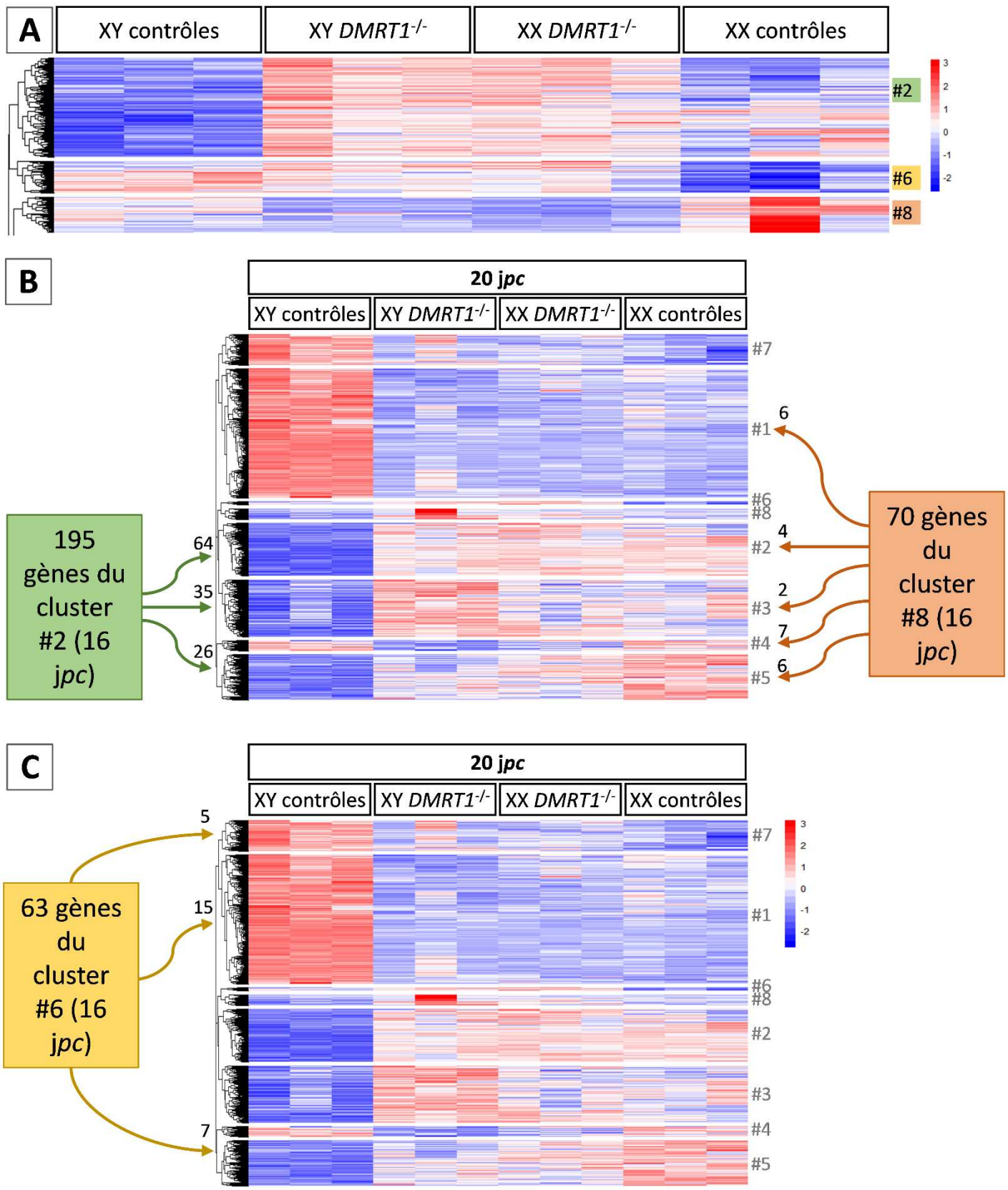
Du fait de l'importance de la voie WNT/*β*-caténine au cours de la différenciation de l'ovaire, j'ai également voulu regarder si d'autres composants de cette voie pouvaient être des cibles de DMRT1 ou de FOXL2. Les gènes pour lesquels un pic a été identifié pour l'un de ces deux facteurs sont répertoriés dans le **Tableau 2**. Pour ce qui est des récepteurs, nous voyons ainsi que dans l'ovaire, DMRT1 se lie au niveau du promoteur/TSS du récepteur *LGR4* alors que FOXL2 se fixe dans un intron de *FZD4* (Frizzled Class Receptor 4) et de *LRP6* (Low density lipoprotein Receptor-related Protein 6). Dans le testicule, DMRT1 se lie au promoteur/TSS de *FZD1* (Frizzled Class Receptor 1), *FZD5* (Frizzled Class Receptor 5) et *LGR4* ainsi que dans un exon de *FZD9* (Frizzled Class Receptor 9). Parmi les ligands de cette voie, trois font partie des cibles identifiées dans nos données. *WNT2B* (WNT family member 2B) est en effet une cible de DMRT1 dans l'ovaire au niveau de son promoteur alors que *WNT5A* (WNT family member 5A) est lié par DMRT1 dans l'ovaire au niveau d'un de ses exons ainsi que par FOXL2 et DMRT1 dans le testicule au niveau de l'un de ses introns. Certaines molécules intracellulaires, notamment celles impliquées dans le complexe de destruction, ont également été retrouvées. Le TTS de *DVL2* (Dishevelled segment polarity



<u>Figure 42.</u> Expression de *AXIN2*, *DKK1*, *DKK2* et *DKK3* dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 et 20 j*pc*. Données brutes d'expression en TPM (Transcripts Per kilobase Million) issues des données de RNA-seq à 16 et 20 j*pc* sur les gonades XY contrôles, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$ ou XX contrôles (n=3) pour (**A**) le gène *AXIN2* ou (**B**) trois inhibiteurs connus de la voie WNT/β-caténine (*DKK1*, *DKK2* et *DKK3*).

protein 2) est ainsi ciblé par DMRT1 dans le testicule. Dans l'ovaire, *LEF1* (Lymphoid Enhancer Factor Family 1), *GSK3B*, *AXIN2* sont ciblés par DMRT1 et FOXL2 alors que *CTNNB1* n'est une cible que de FOXL2 et *APC* que de DMRT1. Nous voyons ainsi que DMRT1 et FOXL2 peuvent réguler de nombreux composants de la voie WNT/*β*-caténine confortant ainsi leur forte implication dans la différenciation ovarienne chez le lapin.

Finalement, je me suis intéressée aux niveaux d'expression de certaines de ces cibles en analysant les données brutes des RNA-seq à 16 et 20 j*pc* dans lesquelles l'expression est évaluée en TPM (Transcripts Per kilobase Million). Ainsi, lorsque l'on regarde le profil pour *AXIN2*, qui est le témoin de l'activation de la voie WNT/*β*-caténine, nous observons une expression qui a tendance à être augmentée dans les gonades dépourvues de DMRT1 aux deux stades **(Figure 42A)**. De plus, lorsque l'on s'intéresse à l'expression des trois *DKK*, connus pour leur rôle inhibiteur de la voie WNT/*β*-caténine (Niehrs, 2006), nous pouvons voir que leur expression est perturbée en l'absence de DMRT1. En effet, à 16 j*pc*, *DKK1* présente une diminution de son expression chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$ par rapport aux XY contrôles mais une légère augmentation chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ par rapport aux XX contrôles **(Figure 42B)**. Ce profil est très intéressant car il correspond à l'exact inverse du profil d'expression de *RSPO1* à 20 j*pc* **(Figure 5B de l'Article)**. Ces différences d'expression sont moins visibles à 20 j*pc* suggérant que DKK1 est l'inhibiteur clé de la voie WNT/*β*-caténine à 16 j*pc*. Alors qu'à 16 j*pc*, *DKK2* (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2) ne présente pas de différence d'expression entre les quatre génotypes, à 20 j*pc*, il est fortement exprimé dans les gonades XY contrôles. Dans les gonades XX et XY *DMRT1*$^{-/-}$, l'expression est plus faible et similaire à celle des XX contrôles **(Figure 42B)**. DKK2 semble donc devenir l'inhibiteur clé à 20 j*pc* dans les gonades XY contrôles. Contrairement à DKK1, la perte de DMRT1 ne perturbe pas l'expression de *DKK2* puisque les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ ont une expression typique des ovaires contrôles. Le profil d'expression de *DKK3* (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3) à 16 j*pc* a tendance à suivre *DKK1* mais avec des différences moins marquées due à une forte variabilité inter-individuelle. A 20 j*pc*, l'expression chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et les XX contrôles est légèrement plus faible chez les XY (contrôles ou *DMRT1*$^{-/-}$) **(Figure 42B)**. Alors que l'expression de d'*AXIN2* semble témoigner d'une activation plus importante de la voie WNT/*β*-caténine dans les gonades dépourvues de DMRT1, les profils d'expression des inhibiteurs contredisent cela, au moins à 16 j*pc*. Il semblerait en effet qu'à ce stade, la voie WNT/*β*-caténine soit un peu plus fortement inhibée par DKK1 dans les gonades XX et XY *DMRT1*$^{-/-}$, confortant l'hypothèse d'un retard de différenciation de ces gonades.



<u>Figure 43.</u> Répartition des gènes des clusters #2, #6 et #8 sur la heatmap à 20 j*pc*.
(**A**) Clusters #2, #6 et #8 de la heatmap représentant les 328 gènes dérégulés sur les 921 gènes au total (*p*-value ajustée <0.05 et |log2FC|>1) entre les XY contrôles, les XY *DMRT1*$^{-/-}$, les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et les XX contrôles à 16 j*pc*. (**B-C**) Répartition des 195 gènes du cluster #2 ou des 70 gènes du cluster #8 (**B**) et des 63 gènes du cluster #6 (**C**) sur la heatmap des 3 461 gènes dérégulés (*p*-value ajustée <0.05 et |log2FC|>1) entre les XY contrôles, les XY *DMRT1*$^{-/-}$, les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et les XX contrôles à 20 j*pc*.

En plus d'avoir un effet sur *RSPO1*, DMRT1 semble donc contrôler de façon plus globale la voie WNT/β-caténine en ciblant aussi bien des récepteurs que des molécules intracellulaires. La perturbation de la mise en place de cette voie de signalisation peut en partie expliquer le retard des gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$.

c. La différenciation gonadique précoce est altérée chez les DMRT1$^{-/-}$

En plus des gènes testiculaires ou ovariens qui ne sont pas exprimés dans les gonades XX et XY *DMRT1*$^{-/-}$, la heatmap met en évidence trois clusters avec un profil d'expression particulier. Le cluster #2 est en effet composé de gènes fortement exprimés dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ (XY et XX) par rapport aux gonades contrôles avec notamment *DMRT1*, *WNT4*, *NR0B1* (Nuclear Receptor subfamily 0 group B member 1), *ESR1* et *CYP19A1*. A l'inverse, le cluster #8 comporte des gènes qui sont plus fortement exprimés par les gonades XY et XX contrôles. Le cluster #6 contient quant à lui des gènes exprimés dans les gonades XY contrôles, XY *DMRT1*$^{-/-}$ et XX *DMRT1*$^{-/-}$ mais pas dans les gonades XX contrôles **(Figure 43A)**.

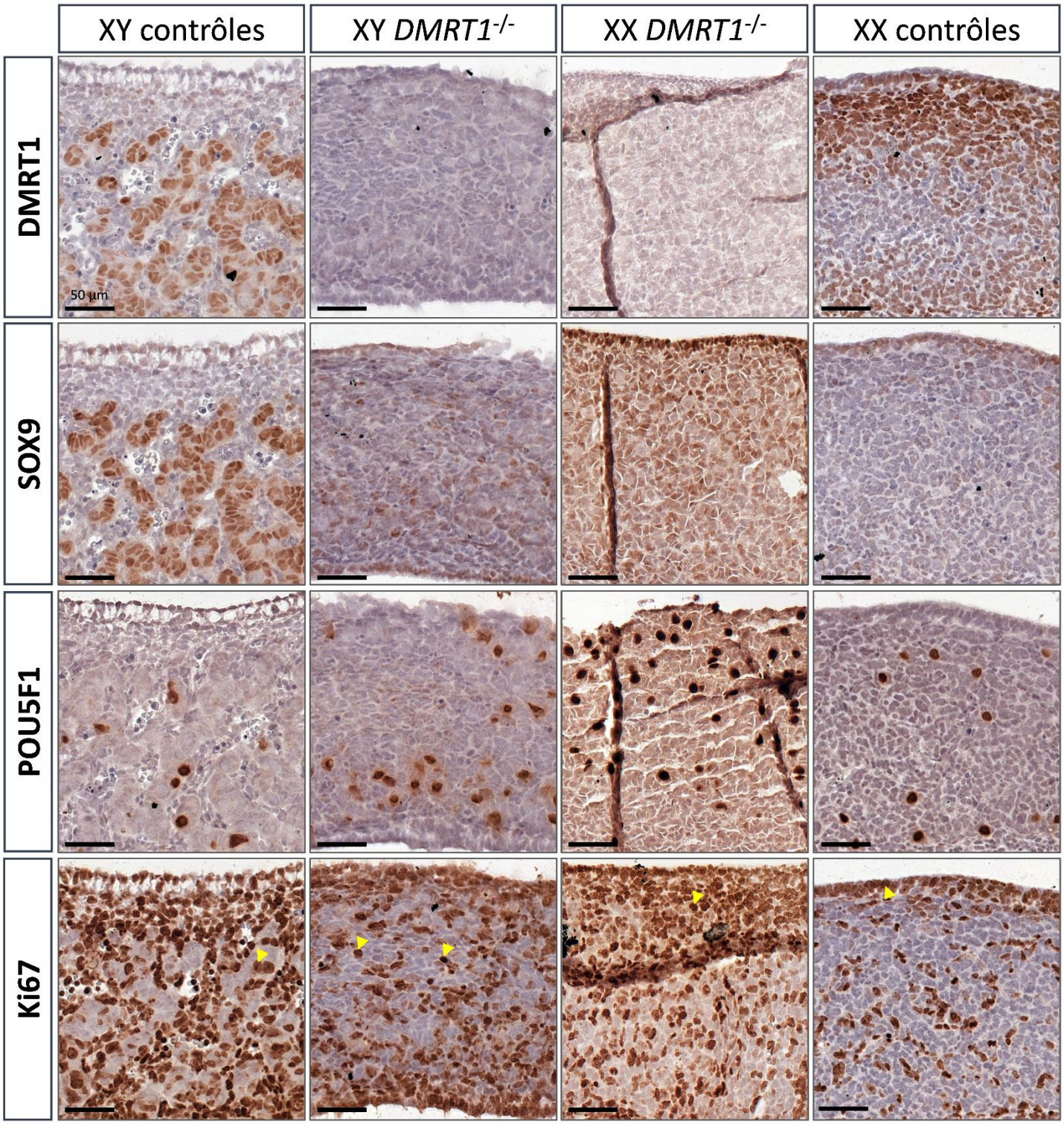
De plus, nous pouvons noter la dynamique d'expression entre 16 et 20 j*pc* avec d'une part l'augmentation du nombre de gènes ayant une expression différentielle entre ces deux stades, et d'autre part avec la façon dont ces gènes sont regroupés. Parmi les 195 gènes du cluster #2 à 16 j*pc*, seulement quatre (*FOXB2* (Forkhead box B2), *DMRT3*, *ASIC4* (Acid Sensing Ion Channel subunit family member 4) et *KIRREL3* (Kirre Like nephrin family adhesion molecule 3)) d'entre eux sont toujours surexprimés chez les *DMRT1*$^{-/-}$ à 20 j*pc* (clusters #6 et #8 ; **Figure 43B**). Les transcrits de *DMRT1* et *DMRT3* sont en quantité plus importante dans les gonades dépourvues de DMRT1. Cela suggère non seulement un rétrocontrôle de la protéine DMRT1 sur l'expression de *DMRT3* mais aussi sur sa propre expression. Pour ce qui est des autres gènes du cluster #2, la majorité se retrouve dans trois autres clusters à 20 j*pc*. Certains gènes sont désormais exprimés chez les XX contrôles et restent surexprimés chez les *DMRT1*$^{-/-}$ (cluster #2 à 20 j*pc* ; **Figure 43B**) ou présentent une expression légèrement diminuée chez les *DMRT1*$^{-/-}$ (cluster #5 à 20 j*pc* ; **Figure 43B**). Ces gènes correspondent donc à des gènes du développement ovarien qui, probablement inhibés par DMRT1, n'étaient pas encore exprimés à 16 j*pc* mais le deviennent à 20 j*pc.* D'autres gènes sont toujours surexprimés chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$, le sont plus faiblement chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et sont maintenant exprimés chez les XX contrôles (cluster #3 à 20 j*pc* ; **Figure 43B**). Le fait que ces gènes soient plus fortement exprimés par les XY *DMRT1*$^{-/-}$ par rapport aux XX (contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$) suggère qu'ils pourraient être inhibés par un gène spécifiquement

exprimé par les gonades XY. Dans l'ensemble, les gènes composant le cluster #2 à 16 j*pc* correspondent donc à des gènes anormalement exprimés à ce stade en l'absence de DMRT1. Nous pouvons imaginer que ces gènes sont inhibés par DMRT1 dans l'ovaire en développement afin de permettre différents événements cellulaires tels que la prolifération avant la mise en place de la cascade génétique ovarienne.

Pour ce qui est des gènes du cluster #8, la grande majorité d'entre eux (44 sur 70) n'est pas retrouvée dans la heatmap à 20 j*pc*. Ces gènes sont désormais exprimés dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ et ne présentent donc plus une expression différentielle dans au moins un des génotypes à ce stade. Pour les autres, nous pouvons voir que certains deviennent spécifiquement exprimés par les XY contrôles (cluster #1 à 20 j*pc* ; **Figure 43B**) ou ont tendance à s'exprimer chez les *DMRT1*$^{-/-}$ de façon plus ou moins similaire aux XX contrôles (clusters #2, #3 et #5 à 20 j*pc* ; **Figure 43B**). Une petite proportion de ces gènes garde le même profil qu'à 16 j*pc* (cluster #4 à 20 j*pc* ; **Figure 43B**). La plupart des gènes de ce cluster ne présentant pas d'expression sexuellement dimorphique à 16 j*pc* et n'étant pas exprimés dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$, finissent par être exprimés dans ces gonades à 20 j*pc*. Nous pouvons penser que ces gènes sont impliqués dans la prolifération cellulaire et que, du fait de leur retard d'expression en absence de DMRT1, la mise en place de ce processus est perturbée.

Enfin, je me suis également intéressée à la dynamique d'expression des 63 gènes du cluster #6. Parmi eux, 29 ne présentent plus une expression différentielle à 20 j*pc*. Les autres gènes se retrouvent principalement exprimés par les XX contrôles (cluster #5 à 20 j*pc* ; **Figure 43C**) ou deviennent spécifiques aux gonades XY contrôles (clusters #7 et #1 à 20 j*pc* ; **Figure 43C**). Les gènes de se cluster semblent correspondre à des gènes qui normalement inhibés par DMRT1, sont anormalement exprimés dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$.

Ces données illustrent ainsi, qu'à 16 j*pc*, les gonades XY qui n'expriment plus DMRT1 ne s'engagent pas dans la voie de différenciation testiculaire. Mais surtout, les gonades XX ne sont pas non plus engagées dans la voie de différenciation ovarienne. En l'absence de DMRT1, les gonades ont un profil d'expression particulier qui pourrait être associé à un défaut de prolifération. En plus de son implication dans la méiose des cellules germinales femelles, DMRT1 semble donc également avoir un rôle dans les stades précoces de la différenciation des cellules somatiques femelles.



<u>Figure 44.</u> Localisation de marqueurs somatiques et germinaux sur des gonades contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*.

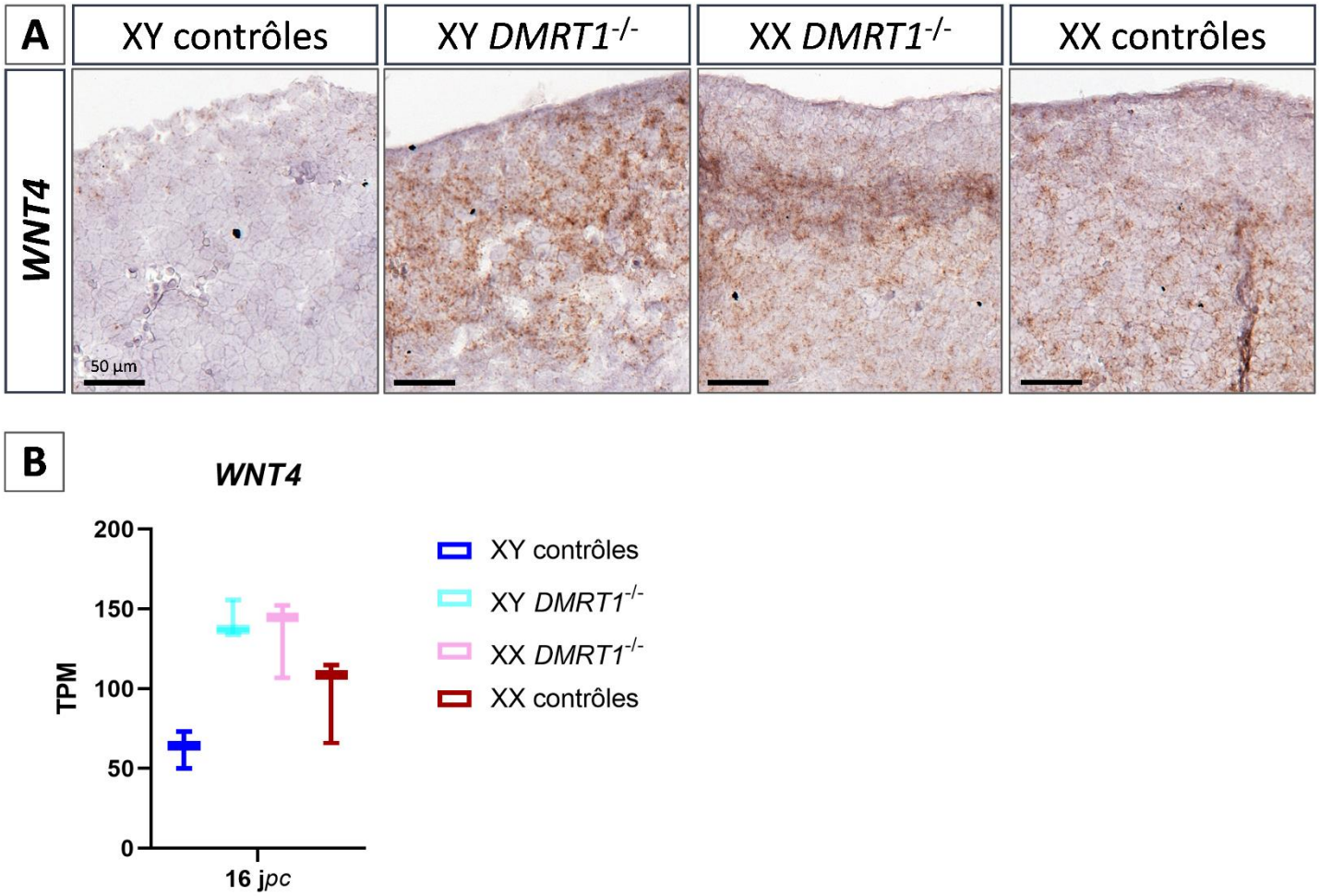
Immunohistochimie de DMRT1, SOX9, POU5F1 ou Ki67 sur des coupes de gonades XY contrôles, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$ et XX contrôles à 16 j*pc.* Barre d'échelle = 50 µm. Têtes de flèches : cellules germinales positives pour Ki67.

2. *Analyses histologiques*

En plus des données transcriptomiques, des analyses d'immunohistochimies ainsi que des hybridations *in situ* ont été réalisées sur les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ en comparaison à des gonades contrôles à ce stade de 16 j*pc*.

Comme illustré dans **l'Article**, à 16 j*pc*, DMRT1 et SOX9 sont présents dans toutes les cellules de Sertoli chez les XY contrôles. Chez les XX, DMRT1 est observé dans une grande partie des cellules somatiques alors que des cellules exprimant SOX9 sont retrouvées majoritairement au niveau de l'épithélium de surface ovarien. La mutation générée par CRISPR/Cas9 causant une absence de production de protéine, aucun signal n'est observé pour DMRT1 en immunohistochimie sur les gonades *DMRT1*$^{-/-}$. De façon assez similaire à ce que nous avions observé à 20 j*pc*, de rares cellules exprimant faiblement SOX9 sont présentes sur les coupes de gonades *DMRT1*$^{-/-}$. Chez les XY, ces cellules ne sont néanmoins pas organisées en cordons séminifères comme dans les testicules contrôles. Les cellules positives sont en revanche majoritairement localisées au niveau de l'épithélium de surface ovarien, comme dans les gonades XX contrôles et certaines sont également dispersées dans la partie médullaire de la gonade. Un profil de marquage similaire semble être retrouvé sur les coupes de gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$ (**Figure 44**).

A ce stade l'absence de DMRT1 n'a pas d'impact sur le développement des cellules germinales puisque le marquage pour POU5F1 (POU class 5 homeobox 1) est très semblable entre les quatre génotypes. En revanche, le marquage pour Ki67 illustre bien qu'à 16 j*pc*, les gonades XX ou XY contrôles ne subissent pas les mêmes évènements cellulaires. Chez les XY, en effet, les cellules de l'épithélium de surface continuent de proliférer mais nous pouvons noter que le tissu commence à devenir plus lâche sous cet épithélium (**Figure 44**). Cela signe l'initiation de la formation de l'albuginée qui sera visible dès 18 j*pc*. Le marquage pour Ki67 est ainsi majoritairement retrouvé au niveau des cellules somatiques au sein ou entre les cordons en formation ainsi que dans quelques rares cellules germinales chez les XY contrôles. Chez les XX contrôles, en revanche, les cellules positives sont principalement localisées au niveau de l'épithélium de surface ovarien. Dans la partie médullaire, certaines cellules somatiques sont marquées mais la plupart d'entre elles ne le sont pas suggérant qu'elles ne prolifèrent pas à ce stade. Au sein des gonades *DMRT1*$^{-/-}$, un grand nombre de cellules exprimant Ki67 sont observées dans l'épithélium cœlomique, de la même façon que dans les ovaires contrôles. Néanmoins, des cellules sont également retrouvées dans la partie médullaire et certaines

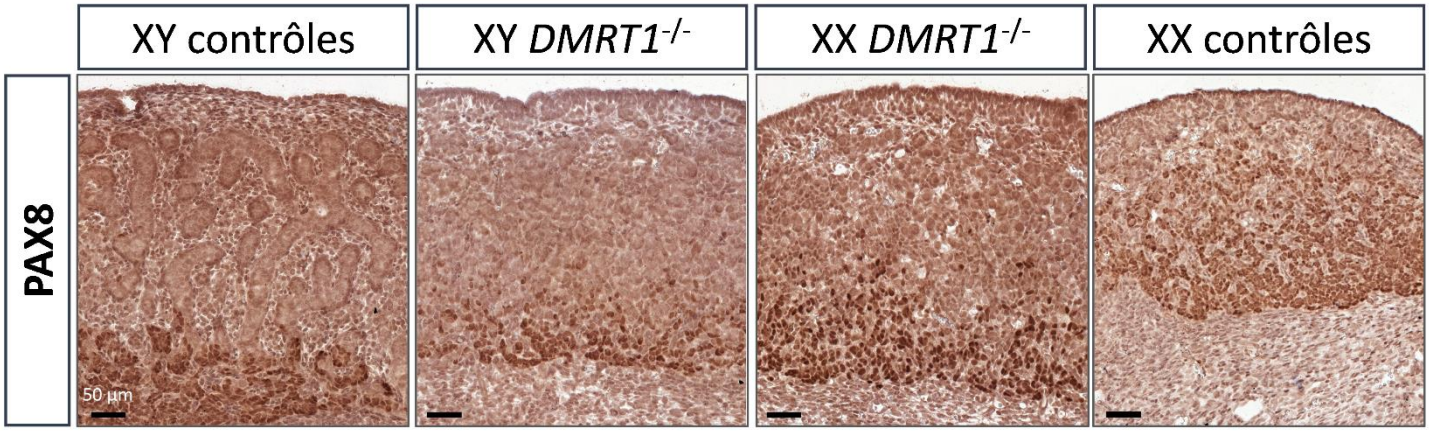


<u>Figure 45.</u> Localisation et expression de *WNT4* dans des gonades contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc*. (**A**) Hybridation *in situ* (technologie RNAscope) de *WNT4* sur des coupes de gonades XY contrôles, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$ et XX contrôles à 16 j*pc.* Barre d'échelle = 50 µm. (**B**) Données brutes d'expression en TPM pour *WNT4* issues des données de RNA-seq à 16 j*pc* sur les gonades XY contrôles, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$ ou XX contrôles (n=3).

cellules germinales semblent également être marquées **(Figure 44)**. Ces données pour Ki67 mettent ainsi en évidence une perturbation de la prolifération chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et XY *DMRT1*$^{-/-}$. A 16 j*pc*, les cellules médullaires des ovaires contrôles ne prolifèrent quasiment plus, permettant déjà la distinction de larges structures s'apparentant à des cordons qui sont en fait les nids ovigères. En revanche, chez les *DMRT1*$^{-/-}$, un grand nombre de ces cellules localisées dans la partie médullaire prolifèrent toujours où la formation des nids ovigères est nettement moins avancée. Ces éléments vont une fois de plus en faveur d'un retard de différenciation en l'absence de DMRT1. Dans l'ovaire, DMRT1 semble donc important pour la prolifération des cellules au cours du développement gonadique très précoce et le début de formation des nids ovigères avant l'action des œstrogènes dont la sécrétion ne débute qu'à partir de 18 j*pc* (Jolivet *et al*, 2022). L'expression de *DMRT1* étant détectée dans l'épithélium de surface ovarien dès 13 j*pc*, le rôle de ce gène sur la prolifération des cellules somatiques ovariennes serait prépondérant jusqu'à la sécrétion oestrogénique, soit durant une période de cinq jours. Cette fonction sur la prolifération des cellules somatiques des deux sexes s'apparente à celle déjà décrite chez la souris pour la voie RSPO1/WNT4/β-caténine (Chassot *et al*, 2012). Ceci renforce les liens étroits qui semblent exister entre DMRT1 et la voie β-caténine canonique mis en évidence par les analyses transcriptomiques.

De ce fait, l'expression de *WNT4* a également été étudiée mais cette fois en hybridation *in situ* puisque nous ne disposons pas d'anticorps qui fonctionne correctement chez le lapin.

Ainsi, pour *WNT4*, un très faible signal est observé chez les XY contrôles avec des points retrouvés principalement au niveau de l'épithélium de surface. Chez les XX contrôles, le signal est retrouvé dans une grande partie de la gonade aussi bien dans l'épithélium de surface ovarien que dans la partie médullaire. Sur les coupes des gonades *DMRT1*$^{-/-}$, un moindre signal semble être observé au niveau de l'épithélium de surface. En revanche, l'intensité de marquage est plus importante chez les XY *DMRT1*$^{-/-}$ par rapport aux XX contrôles. Même s'ils paraissent moins intenses, un plus grand nombre de points semble aussi être retrouvé chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ comparé aux XX contrôles **(Figure 45A)**. Tandis que l'expression de *RSPO1* est diminuée en absence de DMRT1 **(Figure 40B)**, celle de *WNT4* est augmentée dans les gonades XX et XY *DMRT1*$^{-/-}$ à 16 j*pc* **(Figure 45B)**. Alors que DMRT1 semble avoir un rôle d'activateur de *RSPO1* dans l'ovaire, il pourrait plutôt avoir un rôle inhibiteur sur *WNT4*. Chez la souris, la délétion de *Dmrt1* de façon spécifique dans les cellules de Sertoli est aussi associée à une augmentation de l'expression de *Wnt4*. De plus, une fixation de DMRT1 est retrouvée au niveau du gène *Wnt4* suggérant une régulation directe (Matson *et al*, 2011).



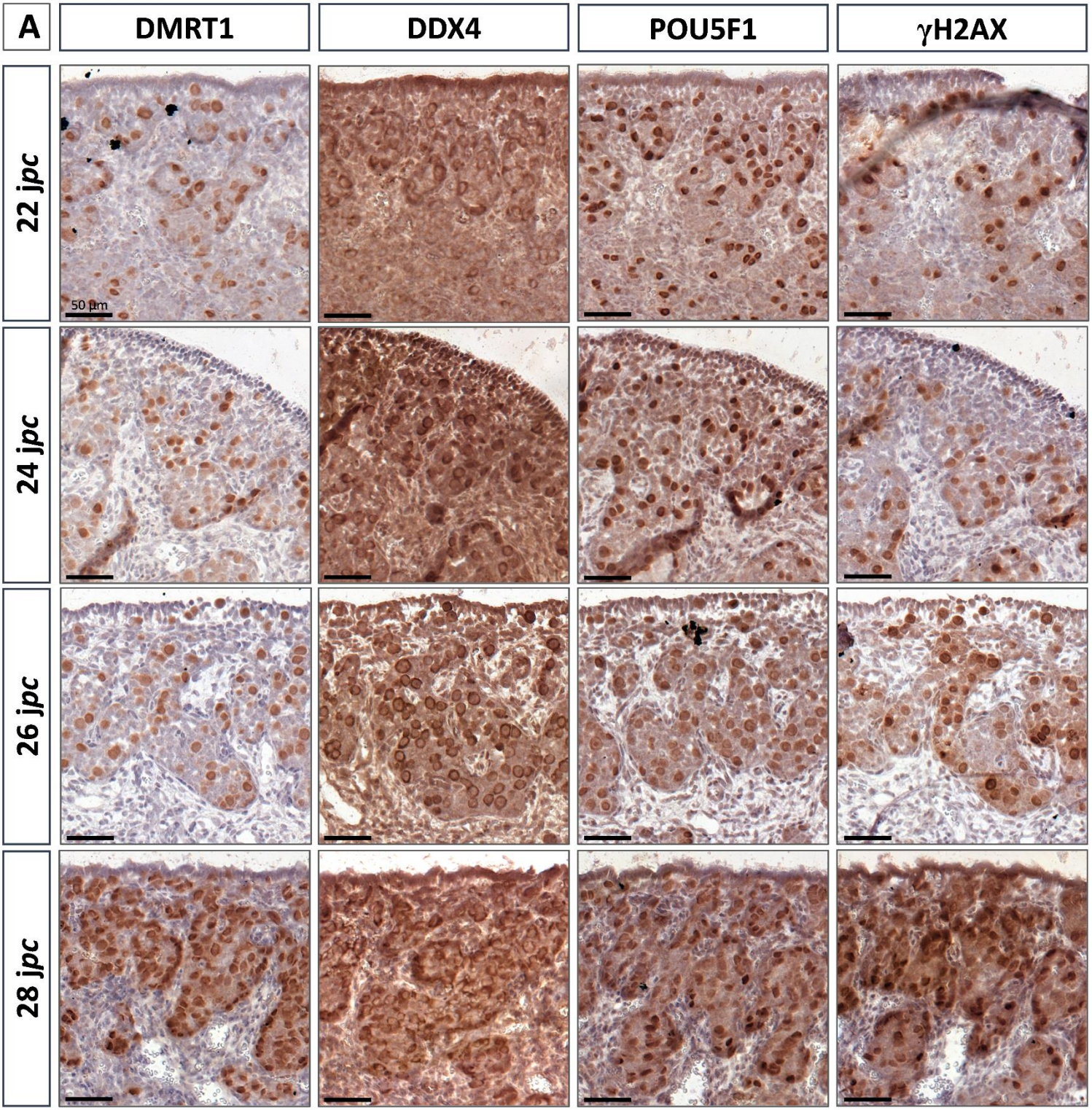
<u>Figure 46.</u> Localisation des SLCs exprimant PAX8 dans des gonades contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$ à 20 j*pc*.

Immunohistochimie de PAX8 sur des coupes de gonades XY contrôles, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$ et XX contrôles à 20 j*pc.* Barre d'échelle = 50 µm.

Par ailleurs, les profils d'expression inverse entre *RSPO1* et *WNT4* sont d'autant plus étonnants que chez la souris, il est suggéré que RSPO1 est nécessaire à l'expression de *Wnt4* (Chassot *et al*, 2008). Cela peut aussi être relié à la prolifération anormale observée dans les gonades dépourvues de DMRT1. Il a en effet été décrit que RSPO1 et WNT4 sont impliqués dans la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique au cours du développement gonadique précoce chez la souris (Chassot *et al*, 2012). Ainsi, chez le lapin, l'expression précoce de DMRT1 permettrait d'initier *RSPO1* et ainsi activer la prolifération de l'épithélium de surface.

Cette expression semble aussi nécessaire à la migration des SLCs. A 15 j*pc*, nous observons ces cellules exprimant PAX8 à la jonction entre la gonade XY et le mésonéphros ou commençant leur migration au sein des gonades XX contrôles **(Figure 2-figure supplement 2 de l'Article)**. De façon intéressante, la localisation de ces cellules à 20 j*pc* est différente en fonction du génotype. Ainsi chez les XY contrôles, les SLCs sont localisées dans la région où le *rete testis* se formera. Chez les XX contrôles, des cellules marquées pour PAX8 sont aussi localisées où le *rete ovarii* se formera mais d'autres sont observées dans la partie médullaire de l'ovaire **(Figure 46)**. Ces cellules peuvent en effet contribuer à la population des cellules de la granulosa (Mayère *et al*, 2022). Chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$, nous pouvons voir que certaines cellules migrent dans la gonade mais ne se retrouvent pas au cœur comme chez les XX contrôles. Dans les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$, les SLCs n'ont pas la même localisation que chez les XY contrôles mais migrent moins que chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et les XX contrôles **(Figure 46)**. La migration des SLCs suit donc l'expression graduelle de *RSPO1* observée à 20 j*pc*. Le défaut de migration des SLCs ainsi que de la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique en l'absence de DMRT1 va impacter le nombre de cellules somatiques ovariennes et peut de ce fait perturber la formation des nids ovigères.

Ainsi, pour conclure, l'ensemble de ces données soulignent que parmi les nombreuses conséquences de l'absence de DMRT1 observées à 20 j*pc,* certaines sont déjà retrouvées à 16 j*pc*. En effet, dès ce stade, les gonades XY *DMRT1*$^{-/-}$ ne sont pas engagées vers la voie de différenciation testiculaire et présentent une absence d'activation de SOX9. En revanche, alors qu'à 20 j*pc*, les gonades *DMRT1*$^{-/-}$, qu'elles soient XX ou XY, sont relativement semblables à des ovaires contrôles, à 16 j*pc*, elles ont un statut de différenciation particulier. D'un point de vue transcriptomique, elles ont en effet une signature qui leur est propre et qui ne correspond pas à la signature d'un engagement vers la voie de différenciation ovarienne. Etonnamment, ces gonades *DMRT1*$^{-/-}$ surexpriment même des gènes de la voie femelle tels que *WNT4* ou



<u>Figure 47.</u> Localisation de DMRT1 comparée à celle de marqueurs des cellules germinales ou de cassures double brins au cours du développement gonadique fœtal.
Immunohistochimie de DMRT1, DDX4, POU5F1 ou γH2AX sur des gonades XX contrôles entre 22 et 28 j*pc*. Barre d'échelle = 50 µm.

CYP19A1 qui ne sont pas encore exprimés à de tels niveaux chez les XX contrôles. Cela souligne que l'absence de DMRT1 perturbe l'environnement somatique ovarien. En plus d'être impliqué dans la détermination testiculaire, DMRT1 est également important au cours du développement ovarien précoce dans le compartiment somatique. Voyons maintenant quels sont ses rôles dans les cellules germinales.

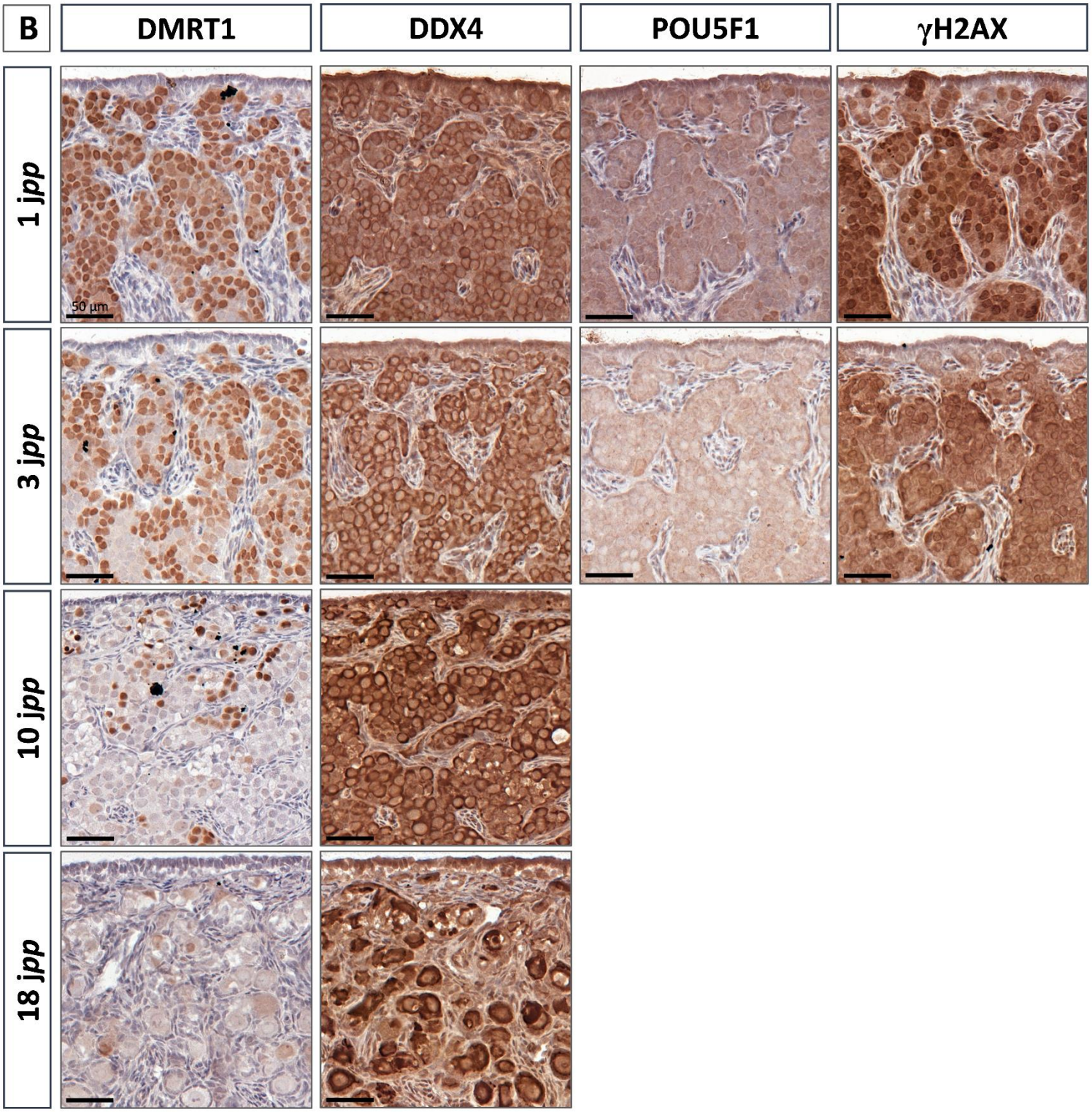
C) Caractérisation du blocage méiotique chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$

Dans **l'Article**, nous avons montré que les femelles *DMRT1*$^{-/-}$ présentent un blocage méiotique conduisant à leur infertilité. Juste après la naissance, alors que les cellules germinales ont initié la méiose chez les XX contrôles, une absence d'entrée en méiose a été observée chez les XX et les XY *DMRT1*$^{-/-}$. Plus tard, vers 18 j*pp*, au moment de l'initiation de la folliculogenèse, les cellules germinales des gonades *DMRT1*$^{-/-}$ sont moins nombreuses et restent regroupées en nids ovigères. L'absence d'entrée en méiose de ces cellules est associée à un blocage du développement ovarien avec une absence de rupture des nids ovigères (absence d'invasion de ces nids par les cellules somatiques), ce qui entraine une absence de formation de follicules primordiaux. A l'âge adulte, les cellules germinales ont disparu et des cellules ressemblant à des cellules lutéales sont observées au sein des gonades XX et les XY *DMRT1*$^{-/-}$ **(Figure 6 de l'Article)**.

Ayant fait le choix de cibler ce premier article sur l'implication de DMRT1 dans la détermination testiculaire, nous n'avions pas caractérisé en détails le phénotype du blocage méiotique. Ainsi, avant de déterminer précisément le moment où les cellules germinales sont bloquées et de comprendre pourquoi elles le sont, nous avons voulu commencer par étudier leur développement chez des femelles contrôles après 20 j*pc* et surtout suivre le profil d'expression de DMRT1 dans ce type cellulaire. Pour cela, je vais me baser sur des données d'immunohistochimies, de RNA-sequencing sur gonades entières à 1 j*pp* ainsi que sur les données de ChIP-sequencing.

1. Développement des cellules germinales femelles chez le lapin

Comme illustré par les **Figures 3C et S3 de l'Article**, chez les femelles, DMRT1 commence à être exprimé dans les cellules germinales à partir de 20 j*pc*. Cette expression va concerner un plus grand nombre de cellules au fur et à mesure du développement de la gonade **(Figure 47)**. Nous notons ainsi une augmentation progressive de cellules germinales exprimant

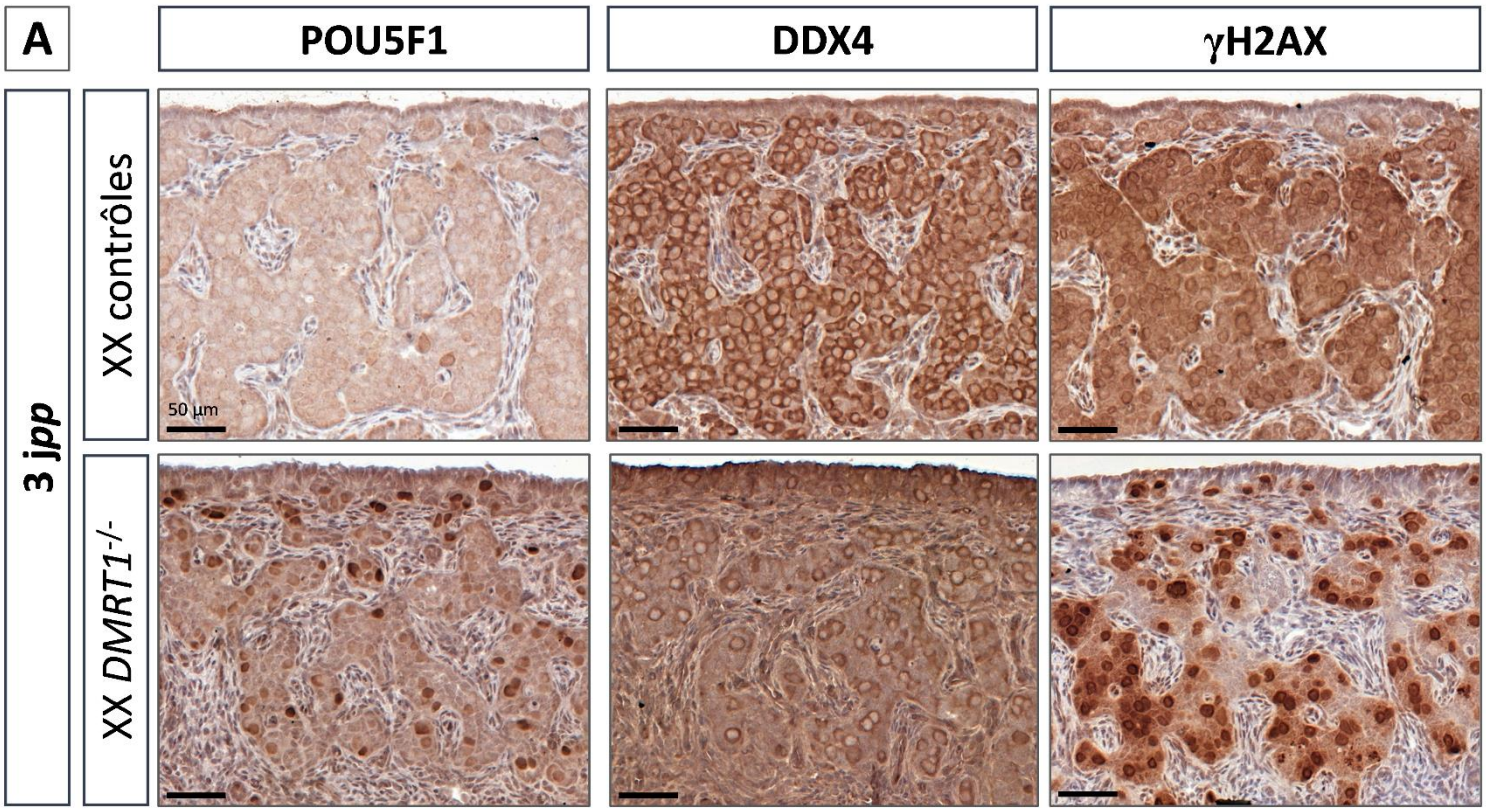


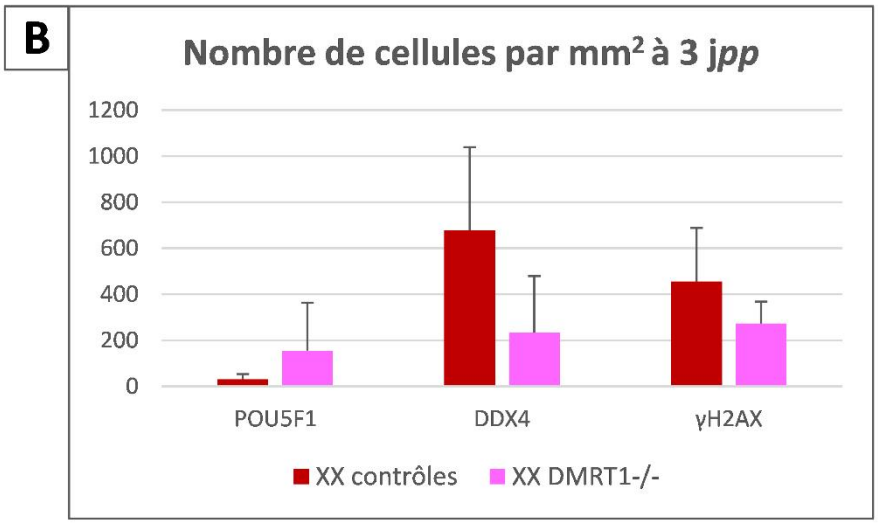
<u>Figure 48.</u> Localisation de DMRT1 comparée à celle de marqueurs des cellules germinales ou de cassures double brins au cours du développement gonadique post-natal.
Immunohistochimie de DMRT1, DDX4, POU5F1 ou γH2AX sur des gonades XX contrôles entre 1 et 18 j*pp*. Barre d'échelle = 50 µm.

DMRT1 entre 22 et 26 j*pc* et cette augmentation s'accentue à 28 j*pc* juste avant que les premières figures de méiose ne soient observables (Hayashi *et al*, 2000; Daniel-Carlier *et al*, 2013). Le nombre maximal de cellules germinales exprimant DMRT1 semble être atteint à 1 j*pp*, alors que dès 3 j*pp*, nous observons que certaines cellules ne sont plus positives pour DMRT1 **(Figure 48)**. De façon intéressante, dès 1 j*pp*, nous pouvons noter que certaines cellules germinales n'ont plus une localisation nucléaire mais plutôt périnucléaire de DMRT1 voire cytoplasmique. Les cellules présentant ce marquage sont surement celles qui sont en train d'éteindre l'expression de DMRT1. Ce changement de localisation a également été observé chez la souris dans les cellules germinales femelles à partir de 14.5 j*pc* avant l'extinction totale de l'expression de *Dmrt1* à 15.5 j*pc* (Krentz *et al*, 2011).

Quelques jours plus tard, à 10 j*pp*, seulement une minorité de cellules germinales demeurent positives pour DMRT1 **(Figure 48)**. L'expression de DMRT1 est finalement éteinte dans toutes les cellules germinales à 18 j*pp* **(Figure 48)**, au moment où la folliculogenèse est initiée chez le lapin (Daniel-Carlier *et al*, 2013). L'expression germinale de *DMRT1* augmente donc jusqu'à l'initiation de la méiose puis s'éteint progressivement en fin de méiose juste avant la folliculogenèse. La forte diminution entre 3 et 10 j*pp* est d'autant plus intéressante qu'elle correspond à la période de transition des ovocytes du stade leptotène au stade zygotène. Alors qu'à 3 j*pp*, certaines ovogonies deviennent des ovocytes au stade leptotène de la prophase I de méiose, elles passeront ensuite au stade zygotène dès 6 j*pp*. Ainsi, dans un ovaire de 10 j*pp*, environ 34% des cellules germinales sont au stade leptotène, 31% en zygotène et 28% sont entrés au stade pachytène (Peters *et al*, 1965). De façon intéressante, en comptant sur quatre zones de la gonade les cellules marquées pour DMRT1 ou DDX4 (Dead-box helicase 4), seulement 42% des cellules positives pour DDX4 expriment encore DMRT1 à 10 j*pp*. Ces données suggèrent que la perte de DMRT1 dans les cellules germinales se fait lors de leur passage au stade zygotène ou pachytène. Néanmoins, étant donné que cette perte est observée dès 3 j*pp* et qu'à ce stade, un grand nombre d'ovocytes au stade zygotène est présent sur des coupes d'ovaires contrôles **(Figure 6 de l'Article)**, nous pouvons penser que DMRT1 s'éteint dans les cellules germinales lors de leur passage au stade zygotène.

Cette dynamique d'expression de *DMRT1* est associée à une autre dynamique au niveau des cellules germinales. Alors qu'à 22 j*pc*, la plupart d'entre elles expriment encore le marqueur de pluripotence POU5F1, certaines sont déjà positives pour DDX4 **(Figure 47)**. A 24 j*pc*, le rapport est toujours en faveur de POU5F1 puis il va avoir tendance à s'équilibrer à 26 et 28 j*pc* **(Figure 47)**. Juste après l'initiation de la méiose, POU5F1 n'est présent que dans une faible proportion de cellules germinales à 1 j*pp* puis devient absent dès 3 j*pp*. Dès ce stade, ces cellules





<u>Figure 49.</u> Localisation de POU5F1, DDX4 et γH2AX sur des gonades contrôles et *DMRT1*$^{-/-}$ à 3 *jpp*.

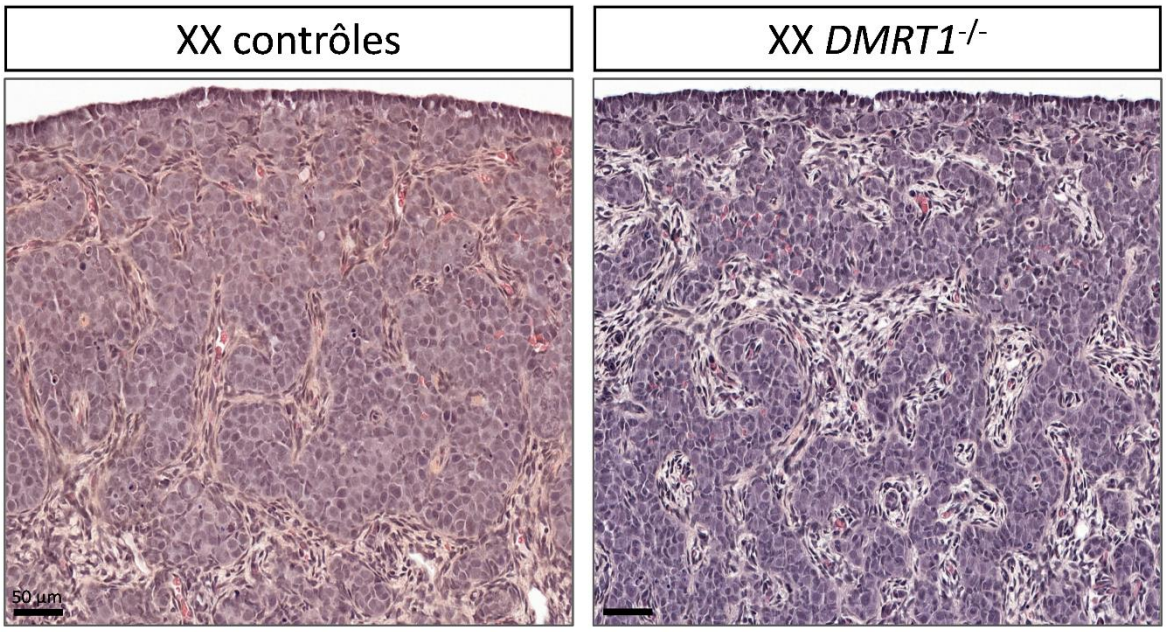
(**A**) Immunohistochimie de POU5F1, DDX4 ou γH2AX sur des coupes de gonades XX contrôles ou XX *DMRT1*$^{-/-}$ à 3 *jpp*. Barre d'échelle = 50 µm. (**B**) Nombre moyen de cellules marquées par POU5F1, DDX4 ou γH2AX par mm^2 obtenu par comptage de trois zones de taille identique. Les barres d'erreur représentent l'écart type standard.

n'exprimeront que DDX4 **(Figure 48)**. Le marqueur de cassures double brins γH2AX est déjà détecté dans certaines cellules germinales à 22 j*pc* **(Figure 47)**. Le nombre de cellules marquées va progressivement augmenter jusqu'à l'initiation de la méiose à 1 j*pp* **(Figures 47 et 48)**. Dès 3 j*pp*, nous pouvons noter que le marquage est moins intense et surtout devient cytoplasmique dans toutes les cellules germinales **(Figure 48)**. Ainsi dès 22 j*pc*, des cellules germinales expriment DDX4 et commencent à avoir des cassures double brins. Au fur et à mesure du développement, l'expression de POU5F1 va diminuer jusqu'à disparaitre dès l'initiation de la méiose. Au fur et à mesure de l'avancée en méiose, les cassures double brins vont être réparées conduisant à la perte progressive de l'expression de γH2AX.

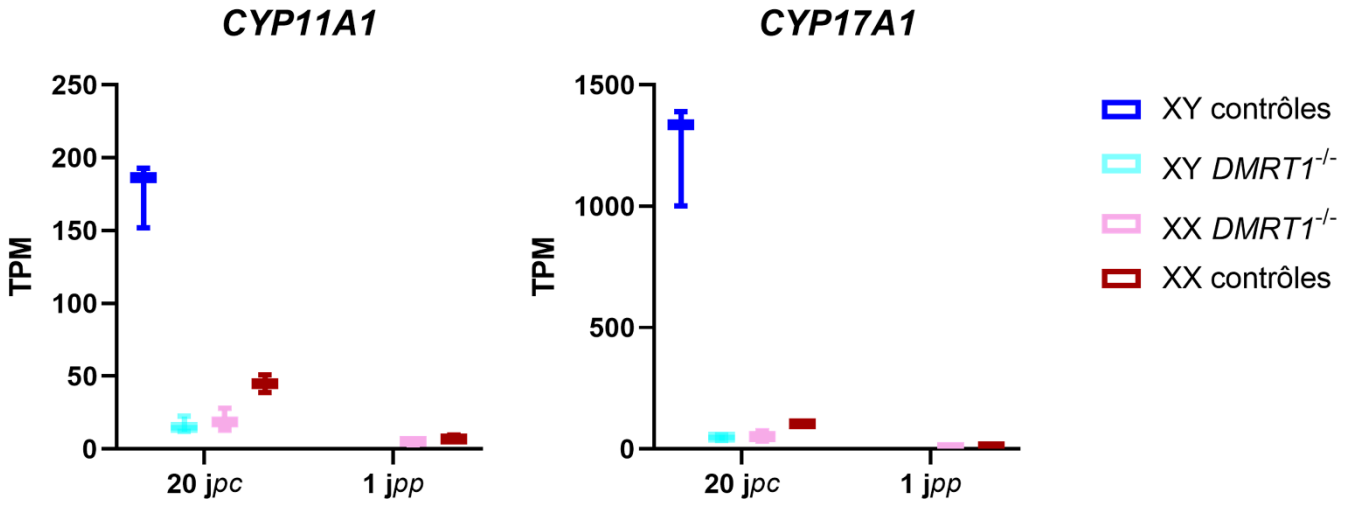
2. *A quel stade les cellules germinales sont-elles bloquées en l'absence de DMRT1 ?*

Les données présentées précédemment suggèrent que les cellules germinales n'expriment plus DMRT1 au moment de leur passage au stade zygotène. De plus, la **Figure 6 de l'Article** illustre que ce stade n'est jamais observé sur des coupes de gonades *DMRT1*$^{-/-}$, qu'elles soient XX ou XY. Par ailleurs, à 3 j*pp*, nous avions pu observer une persistance de l'expression de POU5F1 au sein des gonades *DMRT1*$^{-/-}$ **(Figure 6-figure supplement 1 de l'Article)**. C'est pourquoi nous avons voulu essayer de mieux caractériser ces cellules juste après la naissance.

Dans un premier temps, en plus des marquages pour DDX4 et POU5F1, nous avons réalisé, à 3 j*pp*, une immunohistochimie pour γH2AX, stade où il devient cytoplasmique **(Figure 49)**. Nous observons ainsi que le maintien de POU5F1 chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ est associé à une moindre expression de DDX4. Notons par ailleurs que des cellules semblent ne pas être marquées aussi ni par POU5F1, ni par DDX4. Alors que sur une coupe d'ovaire contrôle, un grand nombre de cellules germinales est marqué pour γH2AX, ce nombre est moins important chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ et il varie en fonction des nids ovigères considérés. Il est aussi important de souligner que chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$, les cellules germinales exprimant γH2AX n'ont pas le même profil que celles des gonades contrôles. Elles présentent en effet un marquage très intense, plutôt périnucléaire alors que chez les contrôles, elles sont faiblement marquées plutôt au niveau du cytoplasme **(Figure 49A)**. J'ai pu quantifier les cellules positives pour les trois protéines étudiées en considérant trois zones, au même endroit de la gonade pour chaque marqueur. Malgré une variabilité assez importante d'une zone à l'autre, nous retrouvons une



<u>Figure 50.</u> Morphologie des gonades XX contrôles et XX *DMRT1*$^{-/-}$ à 1 j*pp*
Coloration HES (Hématoxyline, Eosine et Safranine) sur des coupes de gonades XX contrôles et XX *DMRT1*$^{-/-}$ à 1 j*pp*. Barre d'échelle = 50 µm.



<u>Figure 51.</u> Perturbation de l'expression de deux enzymes de la stéroïdogenèse dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$.
Données brutes d'expression en TPM pour *CYP11A1* et *CYP17A1* issues des données de RNA-seq à 20 j*pc* et 1 j*pp* sur les gonades XY contrôles, XY *DMRT1*$^{-/-}$, XX *DMRT1*$^{-/-}$ ou XX contrôles (n=3).

tendance à un plus grand nombre de cellules germinales marquées pour POU5F1 associée à une diminution de celles positives pour DDX4. Pour ce qui est des cellules positives pour γH2AX, nous retrouvons également une tendance à la diminution du nombre de ces cellules en l'absence de DMRT1 **(Figure 49B)**. Ces données illustrent ainsi qu'à 3 j*pp*, l'absence de DMRT1 perturbe fortement l'expression de DDX4 et, dans une moindre mesure, celle de γH2AX. La perturbation moins importante sur γH2AX peut s'expliquer par le fait que le devenir des cellules marquées chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ n'est pas le même que celui des XX contrôles. Des cassures doubles brins sont en effet retrouvées aussi bien en méiose qu'en apoptose (Saraste & Pulkki, 2000). Alors que chez les contrôles, ces cassures seront réparées par recombinaison homologue, ce n'est peut-être pas le cas chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$. Ainsi, les cellules exprimant γH2AX dans ces gonades peuvent être des cellules apoptotiques plutôt que des cellules méiotiques.

Dans un second temps, du fait que DMRT1 soit présent dans la majorité des cellules germinales à 1 j*pp*, nous avons voulu étudier l'effet de son absence à ce stade. D'un point de vue histologique, les gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$ sont similaires aux XX contrôles mais semblent présenter des nids ovigères moins grands et avec d'avantage de tissu lâche entre ces nids **(Figure 50)**. La présence de ce tissu témoigne d'un défaut de prolifération des cellules germinales. Comme évoqué précédemment, les conséquences de la perte de DMRT1 sur la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique mais aussi sur la migration des SLCs au cœur de l'ovaire peut conduire à une réduction du nombre de cellules somatiques. Etant moins nombreuses, elles ne parviennent pas à combler les espaces entre les nids ovigères. Ce défaut de prolifération peut également être la conséquence d'une perturbation de la synthèse d'hormones stéroïdes. Notre équipe a en effet récemment démontré que, chez le lapin, les œstrogènes sont essentiels à la prolifération de l'épithélium cœlomique mais aussi à la prolifération des cellules germinales femelles. Cela permet ainsi d'avoir un nombre suffisant de cellules somatiques et de cellules germinales pour la folliculogenèse (Jolivet *et al*, 2022). Alors que l'expression de *CYP19A1* commence à atteindre son maximum à 18 j*pc* (Jolivet *et al*, 2022), l'expression d'enzymes clés de la stéroïdogenèse est impactée en l'absence de DMRT1 à 20 j*pc*. *CYP17A1* et *CYP11A1* ont en effet une expression diminuée dans les gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$ et XY *DMRT1*$^{-/-}$ par rapport aux ovaires contrôles **(Figure 51)**. La diminution de l'expression de ces deux enzymes au début de la stéroïdogenèse pourrait donc avoir pour conséquence une moindre production de testostérone pouvant être aromatisée en œstradiol par l'aromatase. Cette perturbation à 20 j*pc* pourrait altérer la prolifération des cellules germinales

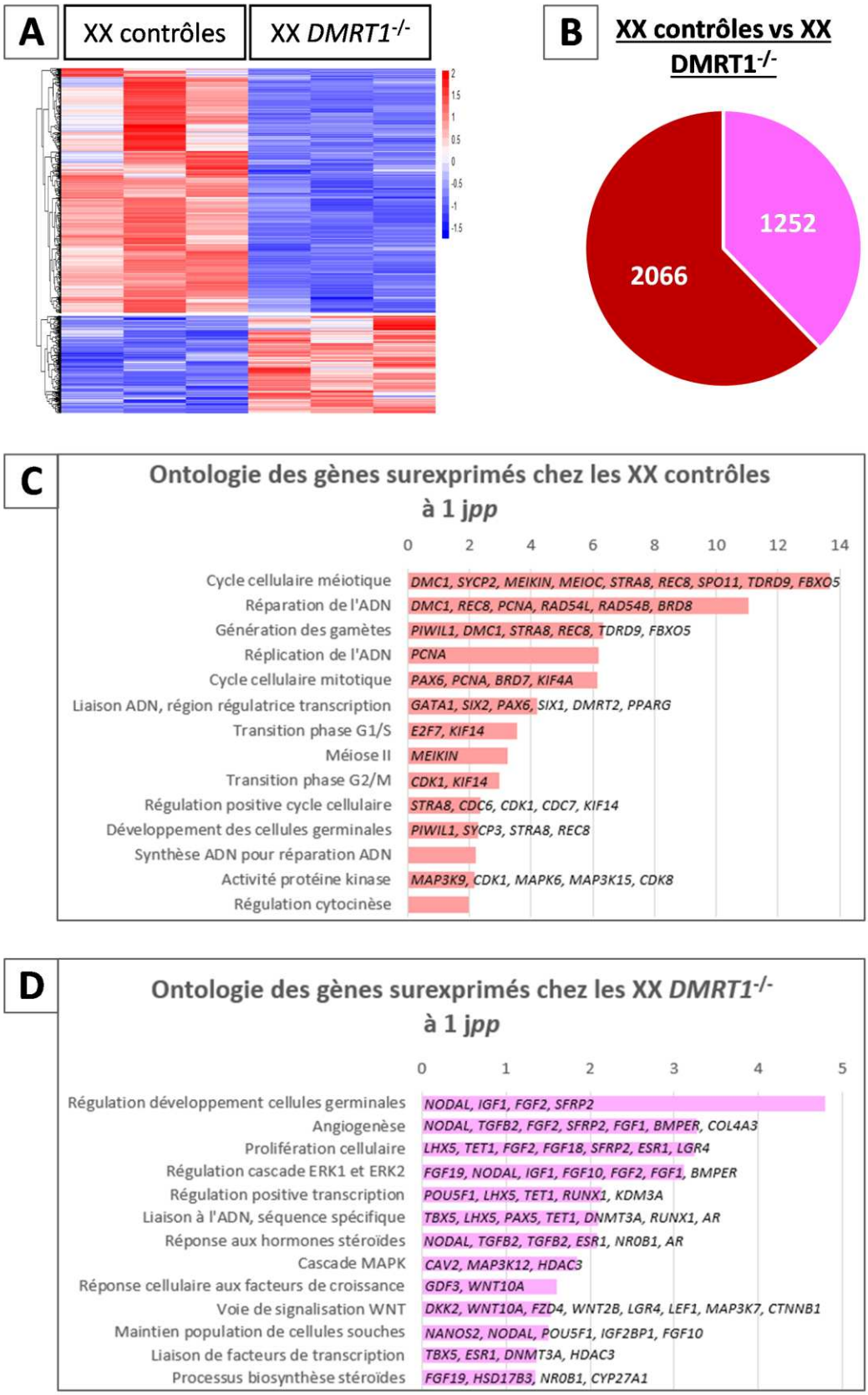


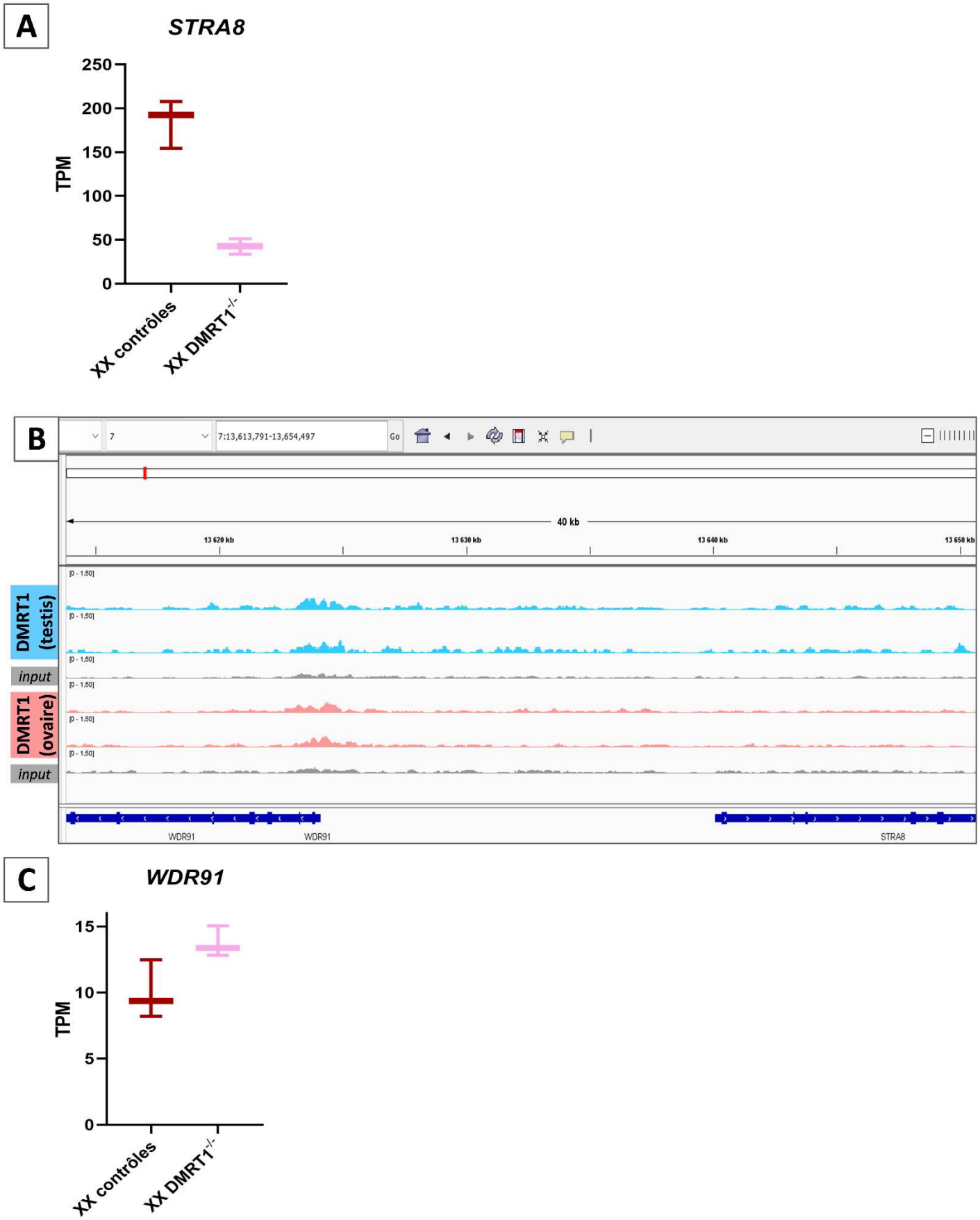
Figure 52. Signature transcriptomique des gonades XX contrôles et XX *DMRT1*$^{-/-}$ à 1 *jpp*.
(**A**) Représentation en heatmap des 1 316 gènes dérégulés (*p*-value ajustée <0.05 et |log2FC|>2) entre les gonades XX contrôles et XX *DMRT1*$^{-/-}$ à 1 *jpp*. (**B**) Nombre de gènes avec une expression différentielle obtenu par analyse DESeq2 sur les données de RNA-seq en tenant compte uniquement d'une valeur de *p*-value ajustée inférieure à 0,05 lors de la comparaison entre les XX contrôles et les XX *DMRT1*$^{-/-}$. Analyses DAVID réalisées avec les identifiants Ensembl des gènes surexprimés chez (**C**) les XX contrôles ou (**D**) les XX *DMRT1*$^{-/-}$. Les termes enrichis les plus pertinents sont représentés. Le nom des gènes les plus connus associés à ces termes sont classés selon une valeur de FoldChange croissant (les premiers gènes sont ceux qui sont les plus différentiellement exprimés).

et des cellules somatiques expliquant ainsi l'observation d'un tissu plus lâche entre les nids ovigères à 1 j*pp*.

D'un point de vue transcriptomique, la représentation en heatmap des 1 316 gènes avec une expression différentielle (*p*-value ajustée <0.05 et |log2FC|>2) montre que les gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$ sont totalement différentes des gonades XX contrôles. Un grand nombre de gènes fortement exprimés chez les contrôles (n=942) sont totalement diminués chez les *DMRT1*$^{-/-}$ qui, par ailleurs, expriment quelques gènes (n=374) faiblement exprimés par les contrôles **(Figure 52A)**. En ne tenant compte que de la valeur de *p*-value (<0.05), ce sont 2 066 gènes qui sont significativement plus exprimés chez les XX contrôles contre 1 252 chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ **(Figure 52B)**.

Une analyse ontologique avec l'outil DAVID a ensuite permis de mettre en évidence les processus dans lesquels ces gènes sont impliqués. Parmi les 45 termes enrichis issus de l'analyse sur les 2 066 gènes surexprimés chez les XX contrôles, celui qui a le score d'enrichissement le plus important rassemble des gènes impliqués dans la méiose tels que *DMC1*, *MEIOC* (Meiosis specific with Coiled-Coil domain), *STRA8* ou encore *REC8*. Différents autres termes tels que la réparation et la réplication de l'ADN, le cycle cellulaire ainsi que le développement des cellules germinales sont également retrouvés **(Figure 52C)**. Ces termes sont cohérents du fait du statut de différenciation des cellules germinales femelles à ce stade. Par conséquent, l'ensemble de ces gènes ont une expression qui est fortement diminuée chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$, révélant ainsi une perturbation du processus méiotique dès son initiation.

En complément, l'analyse DAVID sur les 1 252 gènes surexprimés chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ nous donne des informations sur le statut de différenciation des cellules germinales dans ces gonades. Parmi les 90 termes enrichis, nous retrouvons un terme également associé à la régulation du développement des cellules germinales mais avec des gènes différents tels que *NODAL* (NODAL growth differentiation factor) et *SFRP2* (Secreted Frizzled Related Protein 2). Le premier est par ailleurs retrouvé dans d'autres groupes à savoir l'angiogenèse, la régulation des cascades de signalisation ERK1 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1) et ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 2), ou encore la réponse aux hormones stéroïdes. De plus, *NODAL* se retrouve associé aux gènes impliqués dans le maintien de la population des cellules souches avec *NANOS2* et *POU5F1*. Nous retrouvons également des gènes ayant un rôle dans la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription, la réponse aux facteurs de croissance ainsi que dans la voie de signalisation WNT **(Figure 52D)**. Ces données suggèrent



<u>Figure 53.</u> Profils d'expression et visualisation des données de ChIP-seq au niveau du gène *STRA8*.

(**A**) Données brutes d'expression en TPM issues des données de RNA-seq à 1 *jpp* sur les gonades XX contrôles ou XX *DMRT1*$^{-/-}$ (n=3) pour le gène *STRA8*. (**B**) Capture du logiciel IGV représentant les données de ChIP-seq au niveau des gènes *WDR91* et *STRA8*. (**C**) Données brutes d'expression en TPM issues des données de RNA-seq à 1 *jpp* sur les gonades XX contrôles ou XX *DMRT1*$^{-/-}$ (n=3) pour le gène *WDR91*.

donc qu'en l'absence de DMRT1, les cellules germinales et somatiques des gonades XX continuent de proliférer et d'avoir une activité transcriptionnelle importante à 1 j*pp*. Elles présentent également une augmentation de l'expression des gènes associés à la voie WNT, renforçant ainsi l'hypothèse d'une interaction entre DMRT1 et cette voie dans les cellules somatiques. Finalement, comme nous l'avions observé à 3 j*pp* en **Figure 49A**, le maintien de l'expression de POU5F1 est ici associé au maintien de la population des cellules souches avec de façon intéressante, l'expression de *NANOS2*, gène associé à la différenciation des cellules germinales mâles (Suzuki & Saga, 2008). Chez la souris, l'expression de ce marqueur n'est pas observée dans les gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$ (Krentz *et al*, 2011).

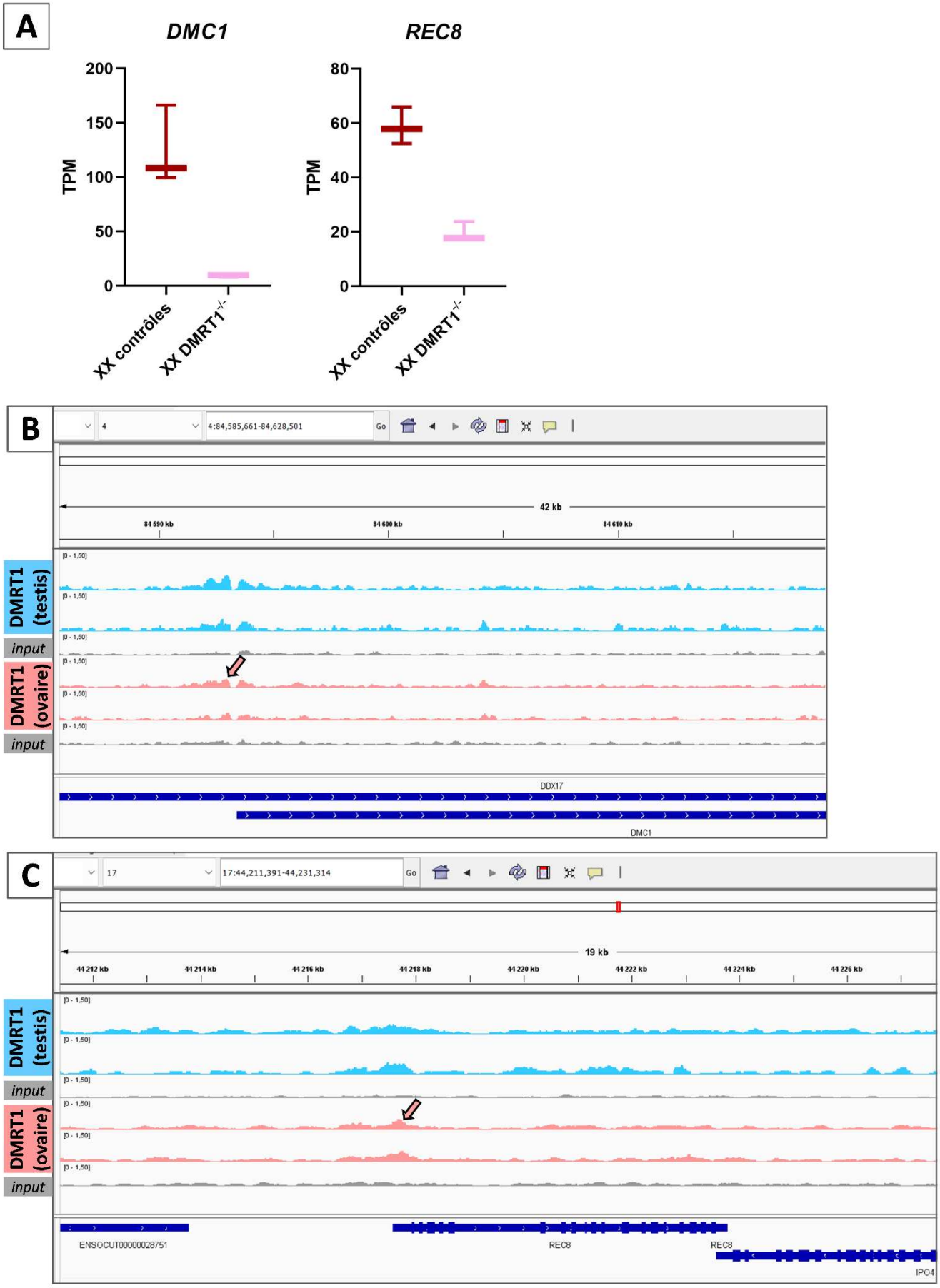
Bien que nous ne soyons toujours pas en mesure de déterminer précisément le stade où le blocage méiotique a lieu, les données de RNA-seq illustrent que les gonades des lapins XX *DMRT1*$^{-/-}$ présentent un retard de différenciation. A 1 j*pp*, elles continuent en effet de proliférer et les cellules germinales restent dans un statut de pluripotence. Alors que certaines parviennent à sortir de ce statut, exprimer DDX4 et subir des cassures doubles brins, d'autres semblent se diriger vers la voie de différenciation mâle avec l'expression d'un facteur clé, le gène *NANOS2*.

3. *Quels facteurs, en aval de DMRT1, peuvent être la cause du blocage méiotique ?*

Les données de ChIP-seq ayant été réalisées dans des ovaires à 28 j*pc*, juste avant l'apparition des premières figures de méiose et où DMRT1 est spécifiquement exprimé par les cellules germinales depuis maintenant 8 jours, nous devrions savoir si DMRT1 a pour cibles des gènes de méiose au sein des cellules germinales.

Le premier gène d'intérêt a été *STRA8* notamment parce que chez la souris, DMRT1 a été décrit comme un régulateur direct de l'expression de *Stra8* dans l'ovaire en se fixant au niveau de son promoteur (Krentz *et al*, 2011). De plus, les données d'expression issues du RNA-seq à 1 j*pp* montrent que l'expression de *STRA8* est fortement diminuée chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ **(Figure 53A)**.

Chez le lapin, les données de ChIP-seq ne montrent pas de fixation du facteur DMRT1 au niveau du gène *STRA8*. La visualisation des données sur IGV révèle néanmoins une fixation au niveau du promoteur du gène *WDR91* (WD Repeat-containing protein 91) situé à 16 kb en amont de *STRA8* **(Figure 53B)**. Du point de vue de son expression à 1 j*pp*, *WDR91* présente



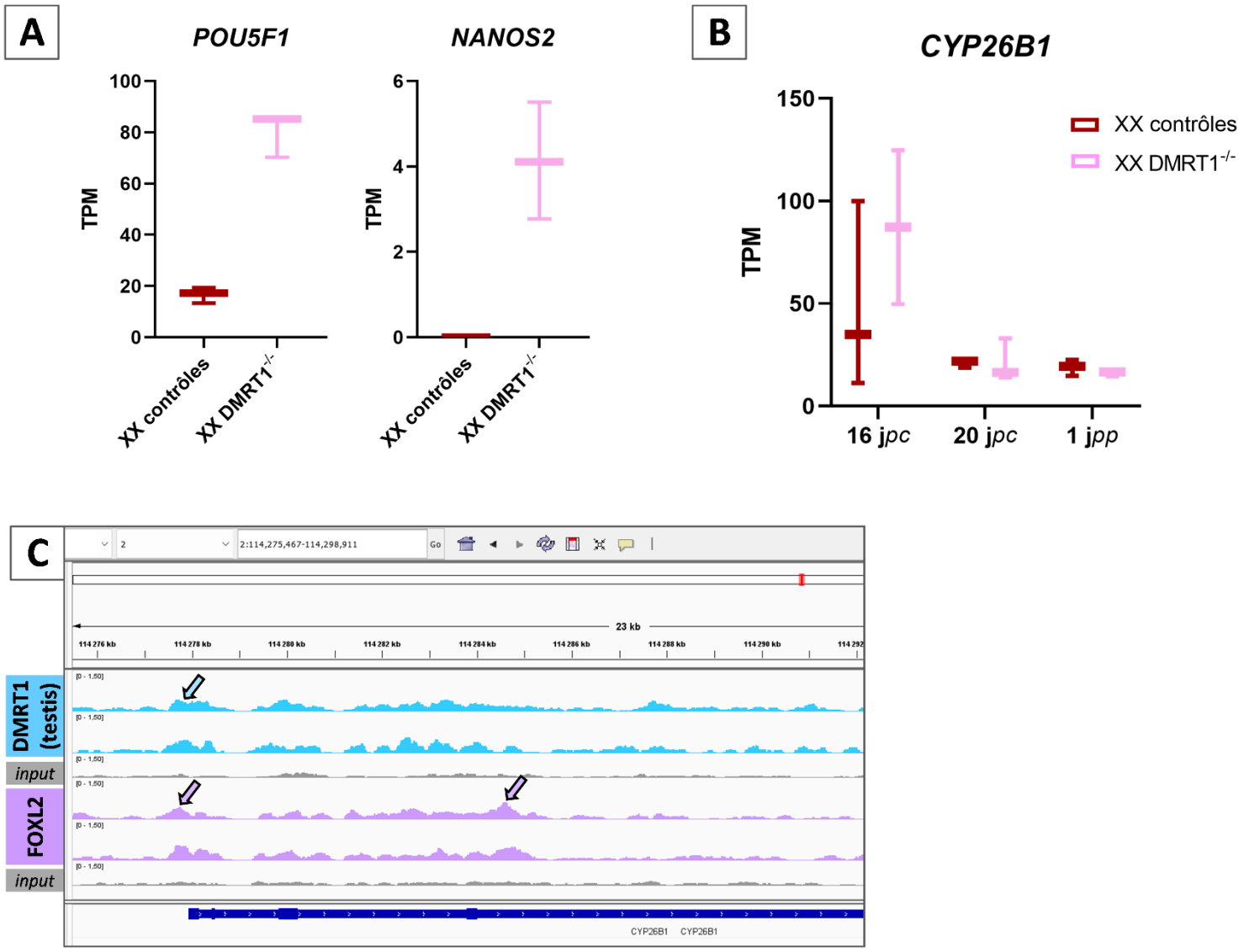
<u>Figure 54.</u> Profils d'expression et visualisation des données de ChIP-seq au niveau des gènes *DMC1* et *REC8*.

(**A**) Données brutes d'expression en TPM issues des données de RNA-seq à 1 *jpp* sur les gonades XX contrôles ou XX *DMRT1*$^{-/-}$ (n=3) pour les gènes *DMC1* et *REC8*. Captures du logiciel IGV représentant les données de ChIP-seq au niveau des gènes (**B**) *DMC1* ou (**C**) *REC8*. Les flèches représentent des pics pour DMRT1 dans l'ovaire identifiés lors de l'annotation comme de « vrais » pics c'est-à-dire reproductibles entre les deux IPs.

plutôt une tendance à l'augmentation chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ **(Figure 53C)**. Même si un rôle au cours de la méiose n'a pas été décrit pour ce gène, il voit son expression augmenter suite à un traitement à l'acide rétinoïque (Wang *et al*, 2016). Bien que le potentiel lien entre STRA8 et WDR91 dans le processus méiotique reste à être étudié, ces deux gènes ont une régulation inverse de leur expression en l'absence de DMRT1. Nous pouvons émettre l'hypothèse, qu'en se fixant au niveau du promoteur de *WDR91* et *via* une boucle chromatinienne, DMRT1 pourrait aller réguler l'expression de *STRA8* dans les cellules germinales. Cette boucle permettrait ainsi une régulation dans une fenêtre de temps spécifique, juste avant l'initiation de la méiose, en diminuant l'expression de *WDR91* au profit de *STRA8*.

Je me suis également focalisée sur deux autres gènes d'intérêts : *DMC1* et *REC8*, tous deux étant surexprimés chez les XX contrôles à 1 j*pp* et appartenant au groupe associé au terme « Cycle cellulaire méiotique ». En effet, *DMC1* est 14 fois plus exprimé chez les XX contrôles par rapport aux XX *DMRT1*$^{-/-}$ alors que *REC8* l'est 3 fois plus **(Figure 54A)**.

L'annotation des pics a pu mettre en évidence un pic pour DMRT1 dans l'ovaire au niveau du promoteur de *DMC1* (chr4:84,592,815-84,593,114) ainsi qu'au niveau du premier exon de *REC8* (chr17:44,217,530-44,217,829). La visualisation sur IGV montre que le pic sur *DMC1* tombe également au niveau d'un intron du gène *DDX17* (Dead-box helicase 17) (chr4:84,516,309-84,674,416) qui chevauche *DMC1* (chr4:84,593,407-84,636,430) **(Figure 54B)** mais dont l'expression n'est pas affectée par l'absence de DMRT1. De la même façon, pour *REC8*, un pic est observable pour DMRT1 dans le testicule **(Figure 54C)**. Les données de RNA-seq et de ChIP-seq nous montrent ainsi que DMRT1 peut réguler directement l'expression de *REC8* et de *DMC1* en se fixant au niveau de leur promoteur. Ces deux gènes ayant un rôle critique au cours de la méiose, ils paraissent être des facteurs clés (cibles directes de DMRT1) pouvant expliquer le phénotype de non engagement en méiose des cellules germinales des gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$. La délétion de *Dmc1* ou de *Rec8* chez la souris conduit en effet à une stérilité mâle et femelle. Dans les gonades *Dmc1*$^{-/-}$, alors que des cellules germinales en début de stade zygotène sont observées, des noyaux plus avancés en zygotène ou en pachytène ne sont jamais observés (Pittman *et al*, 1998; Yoshida *et al*, 1998). Ces observations ont amené à décrire DMC1 comme étant nécessaire à la reconnaissance des chromosomes homologues avant la formation du complexe synaptonémal. Chez les souris *Rec8*$^{-/-}$, le phénotype est assez proche puisque des cellules germinales au stade pachytène ne sont pas non plus observées (Xu *et al*, 2005). D'après ce que nous avions décrit dans le **paragraphe 1.** de cette partie, DMRT1 est exprimé dans les cellules germinales femelles jusqu'au stade leptotène puis s'éteint au stade



<u>Figure 55.</u> Profils d'expression et visualisation des données de ChIP-seq au niveau du gène *CYP26B1*.

Données brutes d'expression en TPM pour les gènes (**A**) *POU5F1* et *NANOS2* issues des données de RNA-seq à 1 j*pp* ou (**B**) *CYP26B1* issues de données de RNA-seq à 16 j*pc*, 20 j*pc* et 1 j*pp* sur les gonades XX contrôles ou XX *DMRT1*$^{-/-}$ (n=3). (**C**) Capture du logiciel IGV représentant les données de ChIP-seq au niveau du gène *CYP26B1*. Les flèches représentent des pics pour DMRT1 dans le testicule ou pour FOXL2 identifiés lors de l'annotation comme de « vrais » pics c'est-à-dire reproductibles entre les deux IPs.

zygotène. Cette expression permettrait ainsi l'initiation de REC8 et DMC1, cruciaux pour poursuivre le processus méiotique jusqu'au stade pachytène.

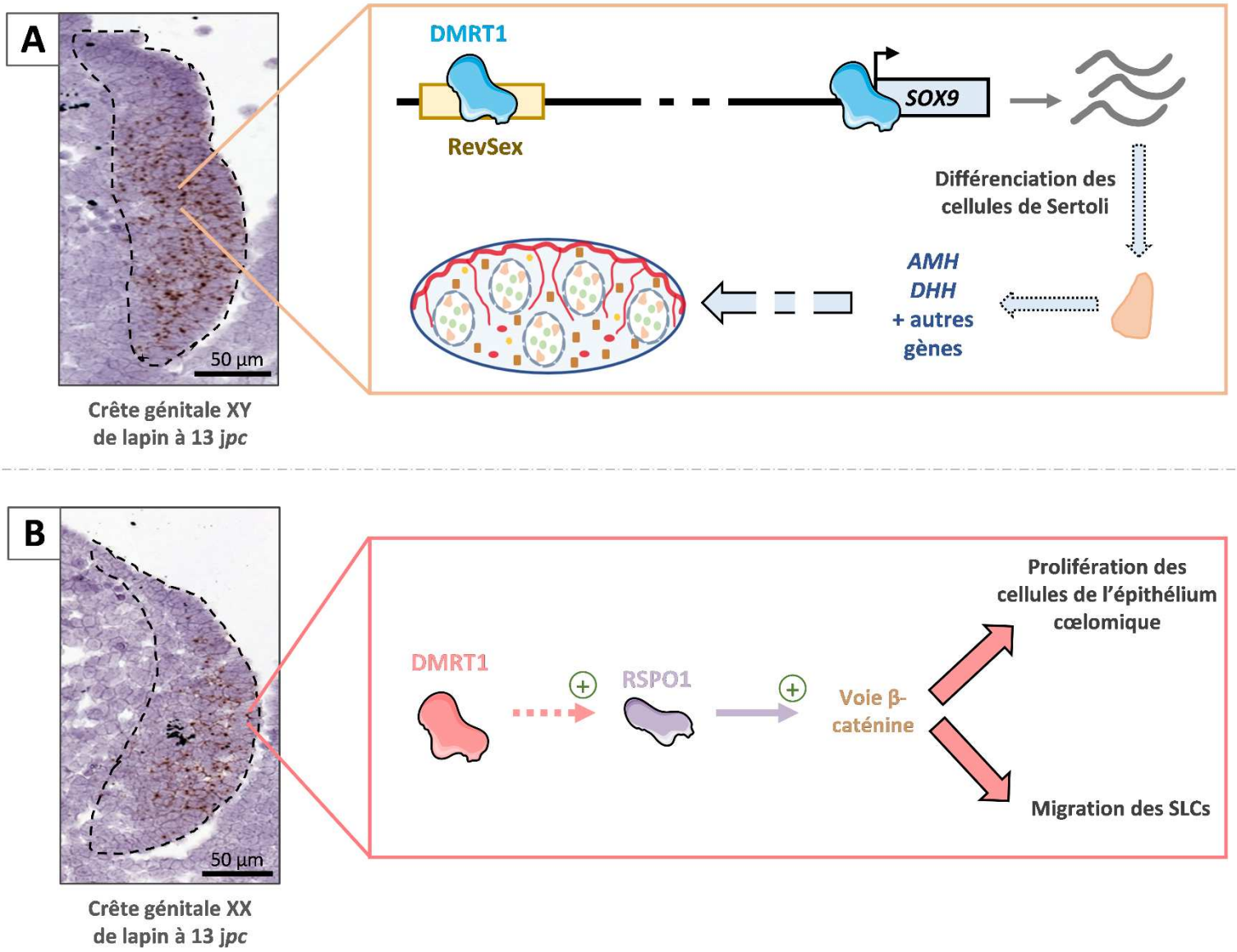
Finalement, l'intérêt a été porté sur deux gènes impliqués dans le maintien de la population des cellules souches : *NANOS2* et *POU5F1*. Comme indiqué précédemment, *POU5F1* est associé à la pluripotence des cellules germinales alors que *NANOS2* est un marqueur de différenciation des cellules germinales mâles. Il permet en effet, chez la souris, de maintenir l'inhibition de l'initiation de la méiose dès lors que l'expression de *Cyp26b1* diminue (Suzuki & Saga, 2008). Exprimé par les cellules somatiques, CYP26B1 permet d'initier l'engagement des cellules germinales vers la voie mâle. Ces cellules exprimeront ensuite NANOS2 qui est le marqueur de cet engagement.

Les gènes *NANOS2* et *POU5F1* présentent, à 1 j*pp*, une expression augmentée chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ par rapport aux XX contrôles **(Figure 55A)**. Alors que l'expression de *NANOS2* n'est jamais détectée dans l'ovaire, les gonades XX dépourvues de DMRT1 finissent par l'exprimer. Ceci peut une nouvelle fois être la conséquence de la perturbation de l'environnement somatique ovarien dès 16 j*pc*. A ce stade, l'expression de *CYP26B1* a tendance à être plus importante chez les XX *DMRT1*$^{-/-}$ puis diminue pour être similaire à celle observée chez les XX contrôles à 20 j*pc* et 1 j*pp* **(Figure 55B)**. Par ailleurs, les données de ChIP-seq révèlent une fixation de DMRT1 dans le testicule et de FOXL2 au niveau du promoteur de *CYP26B1* ainsi qu'une autre fixation de FOXL2 dans le troisième intron **(Figure 55C)**. Par le biais de cette fixation directe, DMRT1 et FOXL2 peuvent avoir des rôles inverses sur l'expression de *CYP26B1*. DMRT1 peut ainsi induire son expression dans les cellules de Sertoli afin qu'elles envoient le signal de différenciation mâle aux cellules germinales. En revanche, dans les cellules de la granulosa, FOXL2 inhiberait plutôt *CYP26B1* afin de protéger la différenciation vers la voie femelle, comme cela a pu être suggéré chez la souris (Kashimada *et al*, 2011). Dans les gonades XX *DMRT1*$^{-/-}$, du fait de la perturbation de la différenciation des cellules somatiques ovariennes en période précoce, l'augmentation de l'expression de *CYP26B1* peut expliquer l'expression de *NANOS2* à 1 j*pp*.

Pour ce qui est de *POU5F1*, les données de ChIP-seq ne montrent pas de fixation directe de DMRT1 au niveau du gène ou autour. Le maintien de son expression semble donc lié à un défaut de différenciation des cellules germinales plutôt qu'à une régulation directe par DMRT1. L'expression de *NANOS2* peut également être la conséquence du maintien de POU5F1. Cela illustre toutefois qu'une partie des cellules germinales XX semble s'orienter vers la voie de différenciation mâle en l'absence de DMRT1.

Chez le lapin, l'implication de DMRT1 dans la méiose des cellules germinales femelles est précoce puisque son expression disparait peu de temps après l'initiation de ce processus. Son rôle semble majoritairement passer par la régulation de l'expression de *STRA8*, *DMC1* et *REC8* directement dans les cellules germinales. Cependant, en l'absence de DMRT1, la perturbation de l'environnement somatique ovarien et l'augmentation de l'expression de *CYP26B1* dès les stades précoces pourrait participer à ce qu'une partie des cellules germinales s'engagent vers la voie de différenciation mâle. Les autres cellules germinales, qui parviennent à exprimer VASA et initier des cassures double brins, ne pourront pas progresser en méiose du fait de la diminution drastique de *STRA8*, *DMC1* et *REC8*. Ces cellules entreront probablement en apoptose expliquant la perte progressive des cellules germinales dans les gonades *DMRT1*$^{-/-}$ après la naissance.

CONCLUSION



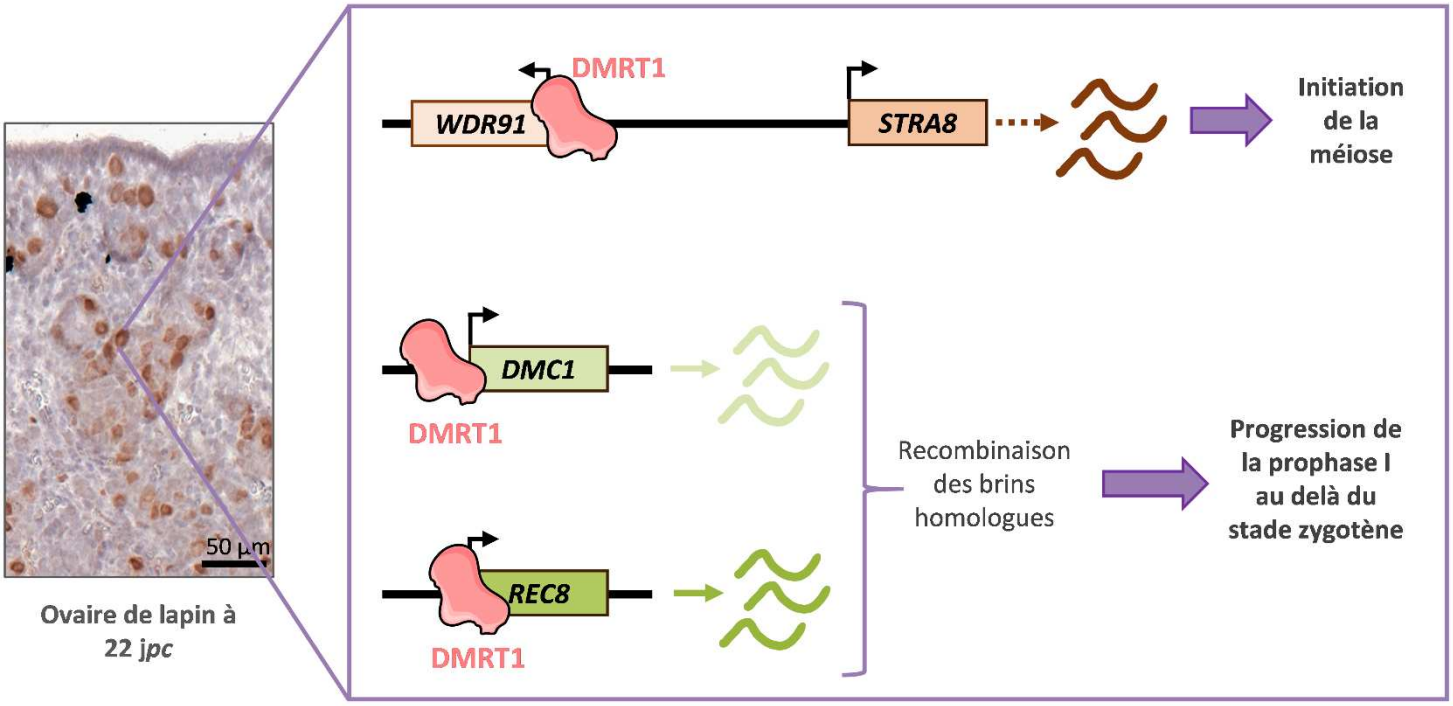
<u>Figure 56.</u> Rôles de DMRT1 dans les cellules de soutien mâles et femelles chez le lapin.
(**A**) L'expression très précoce de *DMRT1* dans les gonades XY est cruciale à l'induction de l'expression de *SOX9* qui dirige la différenciation des cellules de Sertoli. En exprimant notamment l'*AMH* et *DHH*, ces cellules contrôlent la différenciation testiculaire. Nos données mettent en évidence une fixation de DMRT1 au niveau de la région RevSex à 562 kb en amont de *SOX9* et aussi une fixation au niveau de son promoteur. Néanmoins, la fixation de DMRT1 au niveau de l'Enhancer 13 n'est pas à exclure. (**B**) Dans les gonades XX, *DMRT1* est aussi exprimé de façon précoce et en passant par une régulation de *RSPO1*, il semble être impliqué dans la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique ainsi que dans la migration des SLCs contribuant à enrichir la population de cellules de la granulosa à l'âge adulte.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

Conclusion générale et perspectives

L'ensemble de mes travaux de thèse a permis la mise en évidence de plusieurs rôles majeurs de DMRT1 au cours de la différenciation puis du développement gonadique chez le lapin.

Nous montrons ainsi que DMRT1 est requis lors de la détermination testiculaire. En induisant l'expression de *SOX9*, il déclenche la différenciation des cellules de Sertoli qui seront capables d'exprimer l'*AMH* et *DHH* ainsi que d'autres gènes nécessaires à la différenciation du testicule **(Figure 56A)**. Alors que notre hypothèse initiale imaginait une fixation de DMRT1 au niveau de l'enhancer 13, élément régulateur clé de l'expression de *Sox9* chez la souris (Gonen *et al*, 2018), nos données de ChIP-seq ne nous ont pas permis de valider cette hypothèse. Ainsi, il faudrait maintenant réaliser d'autres expériences de ChIP-seq avec un anticorps anti-DMRT1 à un stade plus précoce (16 j*pc* par exemple) ou bien faire du CUT&RUN qui permet de réduire les quantités de matériels utilisés. Ces données permettraient aussi d'obtenir uniquement les cibles de DMRT1 dans les cellules de soutien mâles. De plus, afin de confirmer ce que nous observons à 28 j*pc*, il faudrait valider la fixation de DMRT1 par un ChIP-qPCR au niveau de la région RevSex et du promoteur de *SOX9*.

Avec les résultats complémentaires à ceux publiés dans l'Article, nous montrons que DMRT1 est nécessaire à la différenciation harmonieuse des cellules somatiques au cours des cinq premiers jours du développement de l'ovaire. Plusieurs éléments nous amènent à penser que ce rôle passe par une régulation de la voie RSPO1/WNT4/β-caténine **(Figure 56B)**. En activant la voie β-caténine canonique *via* différents acteurs, DMRT1 pourrait être impliqué dans la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique (Chassot *et al*, 2012). L'expression précoce de DMRT1 dans ces cellules permettrait ainsi de réguler leur prolifération et la migration des SLCs, nécessaires à l'obtention d'un nombre suffisant de précurseurs des cellules somatiques pouvant supporter la différenciation morphologique des ovaires. Pour confirmer cela, plusieurs choses devront être réalisées. La régulation de *RSPO1* par DMRT1 dans les cellules de soutien ovariennes devra être confirmée par du ChIP-seq ou du CUT&RUN à un stade où DMRT1 n'est exprimé que dans les cellules de soutien femelles. Par ailleurs, la plus grande limite que nous avons en réalisant des analyses de transcriptomiques correspond à l'annotation du génome de lapin. L'ajout au génome actuel des séquences intra-géniques, tel



<u>Figure 57.</u> Rôles de DMRT1 dans les cellules germinales femelles chez le lapin.
L'expression de *DMRT1* dans les cellules germinales femelles plus de huit jours avant leur entrée en méiose permettrait de contrôler l'expression de gènes clés de ce processus. Ainsi sa fixation à 16 kb en amont de *STRA8* pourrait lui permettre de contrôler l'entrée en méiose. De plus, sa fixation au niveau de *DMC1* et de *REC8* permettrait la régulation de ces gènes impliqués dans la recombinaison des brins homologues. Les cellules germinales pourront de ce fait progresser au-delà du stade zygotène de prophase I de méiose avant que la protéine DMRT1 ne disparaisse de ces cellules.
Certaines illustrations sont issues de Servier Medical Art.

que nous l'avons réalisé, est suffisant pour les données d'expression mais pas pour les données de ChIP-seq. Ainsi, si une nouvelle version de l'annotation du génome de lapin n'est toujours pas disponible, il sera nécessaire d'ajouter les séquences inter-géniques en amont et en aval des gènes afin d'étudier de potentielles fixations sur des enhancers distaux. De plus, la contribution majeure des SLCs à la population des cellules de la granulosa chez le lapin est en cours de caractérisation en collaboration avec l'équipe de Serge Nef (Genève, Suisse) et de Jennifer McKey (Aurora, Etats-Unis).

Enfin, DMRT1 est également impliqué dans le choix de la destinée, la différenciation puis la méiose des cellules germinales femelles. Tout d'abord, DMRT1 et FOXL2 semblent exercer un rôle antagoniste sur l'expression de *CYP26B1* au tout début de la différenciation des cellules somatiques de l'ovaire. Alors que DMRT1 activerait l'expression de *CYP26B1* dans le testicule afin de protéger les cellules germinales d'une destinée femelle vers l'entrée en méiose, FOXL2 inhiberait cette expression dans l'ovaire.

L'implication de DMRT1 dans la méiose semble quant à elle passer par la régulation de trois gènes clés exprimés cette fois par les cellules germinales elles-mêmes. Alors que chez la souris, une fixation de DMRT1 est observée au niveau du promoteur du gène *Stra8* (Krentz *et al*, 2011), nos données montrent une fixation à 16 kb en amont de *STRA8*, au niveau d'un autre gène, *WDR91* **(Figure 57)**. Néanmoins, en formant une boucle chromatinienne, DMRT1 pourrait aller réguler l'expression de *STRA8* juste avant l'initiation de la méiose. De plus, nos données de ChIP-seq mettent en évidence une fixation de DMRT1 au niveau des promoteurs de *DMC1* et de *REC8* **(Figure 57)**. En régulant l'expression de ces gènes, il serait capable de contrôler la recombinaison des brins homologues nécessaire à la progression des cellules germinales au-delà du stade zygotène de prophase I de méiose. De façon intéressante, c'est à partir de ce stade que l'expression de DMRT1 disparait des cellules germinales. Après l'initiation correcte de la méiose, il n'a pas de rôle plus tardif. Malgré la régulation de ces trois gènes clés et du fait de l'expression de DMRT1 aussi dans les cellules de soutien avec une potentielle régulation de la voie RSPO1/WNT4/β-caténine, nous ne pouvons pas exclure un effet additionnel *via* le compartiment somatique. Il a en effet été décrit chez la souris que cette voie est aussi importante pour la méiose des cellules germinales femelles (Chassot *et al*, 2011; Le Rolle *et al*, 2021). Le seul moyen d'étudier cela serait de réaliser une délétion conditionnelle de DMRT1 dans les cellules de soutien ou dans les cellules germinales. Ces expériences sont très difficiles à mettre en place chez le lapin. Cela dit, le poulet pourrait nous permettre d'étudier l'effet de DMRT1 sur la méiose dans les cellules somatiques ou dans les cellules germinales.

En effet, de façon similaire à ce que nous décrivons chez le lapin, l'invalidation de DMRT1 chez le poulet conduit à une absence d'entrée en méiose des cellules germinales chez les individus ZW *DMRT1* KO (Ioannidis *et al*, 2021). Pour tester le rôle respectif de *DMRT1* dans le compartiment somatique et germinal chez le poulet, deux types d'expérimentation seraient à prévoir. D'un côté, la greffe de cellules germinales déficientes pour *DMRT1* dans des gonades exprimant *DMRT1* nous permettrait d'évaluer le rôle du compartiment somatique sur la destinée des cellules germinales femelles. D'un autre côté, la greffe de cellules germinales exprimant *DMRT1* dans des gonades déficientes pour *DMRT1* nous permettrait d'étudier uniquement l'impact de ce gène dans le développement de la lignée germinale femelle. Une collaboration est d'ores et déjà engagée avec Silvana Guioli, Robin Lovell-Badge (Crick Institute, Londres) et Mike McGrew (Roslin Institute, Edimbourg) afin de conduire ces travaux.

Par ailleurs, certaines observations chez les lapines *DMRT1*$^{-/-}$ nécessitent une caractérisation plus en détails de l'arrêt méiotique. Nous devons en effet étudier l'expression protéique de NANOS2 à 1 j*pp* afin d'estimer le nombre de cellules l'exprimant. Il serait aussi intéressant de voir si les cellules marquées pour γH2AX parviennent à exprimer DMC1 ou bien si elles s'engagent en apoptose. Enfin, il faudrait déterminer le stade précis où il n'y a plus de cellules germinales et aussi caractériser les cellules s'apparentant à des cellules lutéales à l'âge adulte.

Pour finir et conclure, les travaux de ma thèse, initialement engagés pour évaluer le rôle du gène *DMRT1* dans la détermination et la différenciation testiculaire ont atteint l'objectif initial, mais de façon inattendue, ont aussi mis en évidence des rôles sous-évalués voire insoupçonnés dans différents processus de la différenciation ovarienne. *DMRT1*, préalablement décrit comme un gène clé de la différenciation testiculaire chez différents organismes vertébrés et non vertébrés, acquiert, suite à nos travaux, un statut similaire aux gènes *WT1* et *NR5A1* (*SF1*) dans la détermination et la différenciation gonadique. *DMRT1* est impliqué dans les cellules progénitrices des cellules de soutien dans les deux sexes dès la formation des crêtes génitales. Il conserve ensuite des rôles clés dans la différenciation testiculaire (maintien de l'identité des cellules de Sertoli, maintien du stock de spermatogonies souches) et la différenciation ovarienne (méiose des cellules germinales). Ces travaux devraient ouvrir de nombreuses perspectives dans différentes espèces afin de déterminer par exemple (i) la conservation évolutive de son rôle dans les cellules germinales femelles et (ii) l'implication de différents variants protéiques dans différentes pathologiques cliniques d'infertilité mâle et femelle (46, XY DSD, 46, XX DSD, oligozoospermie et azoospermie, insuffisance ovarienne).

Ces travaux soulignent aussi que l'intérêt doit être porté à d'autres modèles animaux que le modèle murin pour l'étude de la détermination du sexe chez l'humain.

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

Adams IR & McLaren A (2002) Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129: 1155–1164

Ademi H, Djari C, Mayère C, Neirijnck Y, Sararols P, Rands CM, Stévant I, Conne B & Nef S (2022) Deciphering the origins and fates of steroidogenic lineages in the mouse testis. *Cell Rep* 39: 110935

Alvarez-Buylla A & Merchant-Larios H (1986) Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp Cell Res* 165: 362–368

Andersson LS, Larhammar M, Memic F, Wootz H, Schwochow D, Rubin C-J, Patra K, Arnason T, Wellbring L, Hjälm G, *et al* (2012) Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature* 488: 642–646

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

Archambeault DR & Yao HH-C (2010) Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proc Natl Acad Sci* 107: 10526–10531

Auguste A, Chassot A-A, Grégoire EP, Renault L, Pannetier M, Treier M, Pailhoux E & Chaboissier M-C (2011) Loss of R-Spondin1 and Foxl2 Amplifies Female-to-Male Sex Reversal in XX Mice. *Sex Dev* 5: 304–317

Ayalon D, Tsafriri A, Lindner HR, Cordova T & Harell A (1972) SERUM GONADOTROPHIN LEVELS IN PRO-OESTROUS RATS IN RELATION TO THE RESUMPTION OF MEIOSIS BY THE OOCYTES. *Reproduction* 31: 51–58

Bagheri-Fam S, Combes AN, Ling CK & Wilhelm D (2020) Heterozygous deletion of Sox9 in mouse mimics the gonadal sex reversal phenotype associated with campomelic dysplasia in humans. *Hum Mol Genet* 29: 3781–3792

Baird DT, Swanston IA & Mcneilly AS (1981) Relationship Between LH, FSH, and Prolactin Concentration and the Secretion of Androgens and Estrogens by the Preovulatory Follicle in the Ewe. *Biol Reprod* 24: 1013–1025

Baker PJ, Sha JA, McBride MW, Peng L, Payne AH & O'Shaughnessy PJ (1999) Expression of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur J Biochem* 260: 911–917

Balciuniene J, Bardwell VJ & Zarkower D (2006) Mice Mutant in the DM Domain Gene Dmrt4 Are Viable and Fertile but Have Polyovular Follicles. *Mol Cell Biol* 26: 8984–8991

Ballow D, Meistrich ML, Matzuk M & Rajkovic A (2006) Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. *Dev Biol* 294: 161–167

Baltus AE, Menke DB, Hu Y-C, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG & Page DC (2006) In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 38: 1430–1434

Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C & Scherer G (2006) Homozygous Inactivation of Sox9 Causes Complete XY Sex Reversal in Mice1. *Biol Reprod* 74: 195–201

Barsoum IB, Bingham NC, Parker KL, Jorgensen JS & Yao HH-C (2009) Activation of the Hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism. *Dev Biol* 329: 96–103

Bartels I, Pütz I, Reintjes N, Netzer C & Shoukier M (2013) Normal intelligence and premature ovarian failure in an adult female with a 7.6 Mb de novo terminal deletion of chromosome 9p. *Eur J Med Genet* 56: 458–462

Bashamboo A, Brauner R, Bignon-Topalovic J, Lortat-Jacob S, Karageorgou V, Lourenco D, Guffanti A & McElreavey K (2014) Mutations in the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Hum Mol Genet* 23: 3657–3665

Baskin LS, Erol A, Jegatheesan P, Li Y, Liu W & Cunha GR (2001) Urethral seam formation and hypospadias. *Cell Tissue Res* 305: 379–387

Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD & Brinster RL (1990) Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature* 345: 167–170

Behringer RR, Finegold MJ & Cate RL (1994) Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79: 415–425

Bellefroid EJ, Leclère L, Saulnier A, Keruzore M, Sirakov M, Vervoort M & De Clercq S (2013) Expanding roles for the evolutionarily conserved Dmrt sex transcriptional regulators during embryogenesis. *Cell Mol Life Sci CMLS* 70: 3829–3845

Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A, Thomas S, Bruland O, David M, Nicolino M, *et al* (2011) Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J Med Genet* 48: 825–830

Bergstrom DE, Young M, Albrecht KH & Eicher EM (2000) Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *genesis* 28: 111–124

Bernard P, Ryan J, Sim H, Czech DP, Sinclair AH, Koopman P & Harley VR (2012) Wnt Signaling in Ovarian Development Inhibits Sf1 Activation of Sox9 via the Tesco Enhancer. *Endocrinology* 153: 901–912

Bernard P, Sim H, Knower K, Vilain E & Harley V (2008) Human SRY inhibits β-catenin-mediated transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2889–2900

Berta P, Hawkins JB, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN & Fellous M (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348: 448–450

Beysen D, De Paepe A & De Baere E (2009) FOXL2 mutations and genomic rearrangements in BPES. *Hum Mutat* 30: 158–169

Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh J-C, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J & Nusse R (1996) A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382: 225–230

Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR & de Crombrugghe B (2001) Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci* 98: 6698–6703

Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, *et al* (2000) The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403: 909–913

Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, Behringer RR & Overbeek PA (2000) A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 26: 490–494

Bogani D, Siggers P, Brixey R, Warr N, Beddow S, Edwards J, Williams D, Wilhelm D, Koopman P, Flavell RA, *et al* (2009) Loss of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4 (MAP3K4) Reveals a Requirement for MAPK Signalling in Mouse Sex Determination. *PLOS Biol* 7: e1000196

Borum K (1961) Oogenesis in the mouse: A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res* 24: 495–507

Boulanger L, Pannetier M, Gall L, Allais-Bonnet A, Elzaiat M, Le Bourhis D, Daniel N, Richard C, Cotinot C, Ghyselinck NB, *et al* (2014) FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr Biol CB* 24: 404–408

Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, *et al* (2006) Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science* 312: 596–600

Bowles J, Schepers G & Koopman P (2000) Phylogeny of the SOX Family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators. *Dev Biol* 227: 239–255

Bradford ST, Hiramatsu R, Maddugoda MP, Bernard P, Chaboissier M-C, Sinclair A, Schedl A, Harley V, Kanai Y, Koopman P, *et al* (2009) The Cerebellin 4 Precursor Gene Is a Direct Target of SRY and SOX9 in Mice1. *Biol Reprod* 80: 1178–1188

Bradford ST, Wilhelm D & Koopman P (2008) Comparative Analysis of Anti-Mouse SRY Antibodies. *Sex Dev* 1: 305–310

Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM & Saunders PT (1994) Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135: 1227–1234

Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones MEE, Simpson ER & Findlay JK (2000) An Age-Related Ovarian Phenotype in Mice with Targeted Disruption of the Cyp 19 (Aromatase) Gene*. *Endocrinology* 141: 2614–2623

Buehr M, Gu S & McLaren A (1993a) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117: 273–281

Buehr M, McLaren A, Bartley A & Darling S (1993b) Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. *Dev Dyn* 198: 182–189

Bullejos M & Koopman P (2001) Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn* 221: 201–205

Bullejos M & Koopman P (2004) Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 68: 422–428

Buonocore F, Clifford-Mobley O, King TFJ, Striglioni N, Man E, Suntharalingham JP, del Valle I, Lin L, Lagos CF, Rumsby G, *et al* (2019) Next-Generation Sequencing Reveals Novel Genetic

Variants (SRY, DMRT1, NR5A1, DHH, DHX37) in Adults With 46,XY DSD. *J Endocr Soc* 3: 2341–2360

Burtis KC & Baker BS (1989) Drosophila doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* 56: 997–1010

Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A & Liu Q (2011) R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/β-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci* 108: 11452–11457

Chaboissier M-C, Kobayashi A, Vidal VIP, Lützkendorf S, van de Kant HJG, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR & Schedl A (2004) Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131: 1891–1901

Chang H & Matzuk MM (2001) Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev* 104: 61–67

Channing CP, Hillensjo T & Schaerf FW (1978) Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals. *Clin Endocrinol Metab* 7: 601–624

Chassot A-A, Bradford ST, Auguste A, Gregoire EP, Pailhoux E, de Rooij DG, Schedl A & Chaboissier M-C (2012) WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development* 139: 4461–4472

Chassot A-A, Gregoire EP, Lavery R, Taketo MM, Rooij DG de, Adams IR & Chaboissier M-C (2011) RSPO1/β-Catenin Signaling Pathway Regulates Oogonia Differentiation and Entry into Meiosis in the Mouse Fetal Ovary. *PLOS ONE* 6: e25641

Chassot A-A, Le Rolle M, Jolivet G, Stevant I, Guigonis J-M, Da Silva F, Nef S, Pailhoux E, Schedl A, Ghyselinck NB, *et al* (2020) Retinoic acid synthesis by ALDH1A proteins is dispensable for meiosis initiation in the mouse fetal ovary. *Sci Adv* 6: eaaz1261

Chassot A-A, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A & Chaboissier M-C (2008) Activation of β-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 17: 1264–1277

Chauhan V, Jyotsna VP, Jain V, Khadgawat R & Dada R (2017) Novel Heterozygous Genetic Variants in Patients with 46,XY Gonadal Dysgenesis. *Horm Metab Res* 49: 36–42

Chretien PFC (1966) Etude de l'origine, de la migration et de la multiplication des cellules germinales chez l'embryon de lapin. *Development* 16: 591–607

Clark AM, Garland KK & Russell LD (2000) Desert hedgehog (Dhh) Gene Is Required in the Mouse Testis for Formation of Adult-Type Leydig Cells and Normal Development of Peritubular Cells and Seminiferous Tubules. *Biol Reprod* 63: 1825–1838

Clark JM & Eddy EM (1975) Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev Biol* 47: 136–155

Clepet C, Schater AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R & Goodfellow PN (1993) The human SRY transcript. *Hum Mol Genet* 2: 2007–2012

Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112: 35–51

Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, Servel N, Xia X, Pannetier M, Baere ED, Messiaen L, Cotinot C, Fellous M, *et al* (2002) Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet* 39: 916–921

Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A & Koopman P (2009) Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol* 326: 112–120

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

Croft B, Ohnesorg T, Hewitt J, Bowles J, Quinn A, Tan J, Corbin V, Pelosi E, van den Bergen J, Sreenivasan R, *et al* (2018) Human sex reversal is caused by duplication or deletion of core enhancers upstream of SOX9. *Nat Commun* 9: 5319

Dai S, Qi S, Wei X, Liu X, Li Y, Zhou X, Xiao H, Lu B, Wang D & Li M (2021) Germline sexual fate is determined by the antagonistic action of dmrt1 and foxl3/foxl2 in tilapia. *Development*

Daniel-Carlier N, Harscoët E, Thépot D, Auguste A, Pailhoux E & Jolivet G (2013) Gonad differentiation in the rabbit: evidence of species-specific features. *PloS One* 8: e60451

Davidson AJ, Lewis P, Przepiorski A & Sander V (2019) Turning mesoderm into kidney. *Semin Cell Dev Biol* 91: 86–93

De Baere E, Dixon MJ, Small KW, Jabs EW, Leroy BP, Devriendt K, Gillerot Y, Mortier G, Meire F, Van Maldergem L, *et al* (2001) Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype–phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 10: 1591–1600

de Bakker BS, van den Hoff MJB, Vize PD & Oostra RJ (2019) The Pronephros; a Fresh Perspective. *Integr Comp Biol* 59: 29–47

De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F & Berta P (1998) Direct Interaction of SRY-Related Protein SOX9 and Steroidogenic Factor 1 Regulates Transcription of the Human Anti-Müllerian Hormone Gene. *Mol Cell Biol* 18: 6653–6665

DeFalco T, Takahashi S & Capel B (2011) Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev Biol* 352: 14–26

Díaz-Hernández V, Río AL del, Zamora M & Merchant-Larios H (2008) Expression Profiles of SRY and SOX9 in Rabbit Gonads: The Classical Model of Mammalian Sex Differentiation. *Sex Dev* 2: 152–166

Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J & Wylie CC (1986) Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44: 831–838

Dubin RA & Ostrer H (1994) Sry is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol* 8: 1182–1192

Dujardin E & Pailhoux E (2022) Génétique de la différenciation gonadique, une étape clé du déterminisme du sexe et de la fertilité à l'âge adulte. *Médecine Reprod* 24: 194–201

Edson MA, Nagaraja AK & Matzuk MM (2009) The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocr Rev* 30: 624–712

Elejalde BR, Opitz JM, de Elejalde MM, Gilbert EF, Abellera M, Meisner L, Lebel RR, Hartigan JM & Breg WR (1984) Tandem dup(1p) within the short arm of chromosome 1 in a child with ambiguous genitalia and multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet* 17: 723–730

El-Mogharbel N, Wakefield M, Deakin JE, Tsend-Ayush E, Grützner F, Alsop A, Ezaz T & Marshall Graves JA (2007) DMRT gene cluster analysis in the platypus: New insights into genomic organization and regulatory regions. *Genomics* 89: 10–21

Elzaiat M, Jouneau L, Thépot D, Klopp C, Allais-Bonnet A, Cabau C, André M, Chaffaux S, Cribiu E-P, Pailhoux E, *et al* (2014) High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats. *Biol Reprod* 91: 153

Emich J, Gaikwad AS, Stallmeyer B, Fietz D, Schuppe H-C, Oud MS, Kliesch S, Gromoll J, Friedrich C & Tüttelmann F (2023) Functional assessment of DMRT1 variants and their pathogenicity for isolated male infertility. *Fertil Steril* 119: 219–228

Enders GC & May JJ (1994) Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev Biol* 163: 331–340

Erdman S & Burtis K (1993) The Drosophila doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO J* 12: 527–535

Ewen KA & Koopman P (2010) Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol* 323: 76–93

Fahrioglu U, Murphy MW, Zarkower D & Bardwell VJ (2007) mRNA expression analysis and the molecular basis of neonatal testis defects in Dmrt1 mutant mice. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ* 1: 42–58

Fan Y, Zhang X, Wang L, Wang R, Huang Z, Sun Y, Yao R, Huang X, Ye J, Han L, *et al* (2017) Diagnostic Application of Targeted Next-Generation Sequencing of 80 Genes Associated with Disorders of Sexual Development. *Sci Rep* 7: 44536

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, *et al* (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372: 525–530

Frost ER, Ford EA, Peters AE, Lovell-Badge R, Taylor G, McLaughlin EA & Sutherland JM (2022) A New Understanding, Guided by Single-Cell Sequencing, of the Establishment and Maintenance of the Ovarian Reserve in Mammals. *Sex Dev*: 1–11

Fujimoto Y, Tanaka SS, Yamaguchi YL, Kobayashi H, Kuroki S, Tachibana M, Shinomura M, Kanai Y, Morohashi K, Kawakami K, *et al* (2013) Homeoproteins Six1 and Six4 Regulate Male Sex Determination and Mouse Gonadal Development. *Dev Cell* 26: 416–430

García-Castro MI, Anderson R, Heasman J & Wylie C (1997) Interactions between Germ Cells and Extracellular Matrix Glycoproteins during Migration and Gonad Assembly in the Mouse Embryo. *J Cell Biol* 138: 471–480

Garcia-Moreno SA, Futtner CR, Salamone IM, Gonen N, Lovell-Badge R & Maatouk DM (2019) Gonadal supporting cells acquire sex-specific chromatin landscapes during mammalian sex determination. *Dev Biol* 446: 168–179

Garcia-Moreno SA, Plebanek MP & Capel B (2018) Epigenetic regulation of male fate commitment from an initially bipotential system. *Mol Cell Endocrinol* 468: 19–30

Garcia-Ortiz JE, Pelosi E, Omari S, Nedorezov T, Piao Y, Karmazin J, Uda M, Cao A, Cole SW, Forabosco A, *et al* (2009) Foxl2functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Dev Biol* 9: 36

Gasca S, Cañizares J, de Santa Barbara P, Méjean C, Poulat F, Berta P & Boizet-Bonhoure B (2002) A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 11199–11204

Ge C, Ye J, Zhang H, Zhang Y, Sun W, Sang Y, Capel B & Qian G (2017) Dmrt1 induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. *Development* 144: 2222–2233

George FW, Milewich L & Wilson JD (1978) Oestrogen content of the embryonic rabbit ovary. *Nature* 274: 172–173

George FW & Wilson J (1978) Conversion of Androgen to Estrogen by the Human Fetal Ovary*. *J Clin Endocrinol Metab* 47: 550–555

Georges A, L'Hôte D, Todeschini AL, Auguste A, Legois B, Zider A & Veitia RA (2014) The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *eLife* 3: e04207

Gill ME, Hu Y-C, Lin Y & Page DC (2011) Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proc Natl Acad Sci* 108: 7443–7448

Gondos B, Byskov AG & Hansen JL (1996) Regulation of the onset of meiosis in the developing testis. *Ann Clin Lab Sci* 26: 421–425

Gonen N, Futtner CR, Wood S, Garcia-Moreno SA, Salamone IM, Samson SC, Sekido R, Poulat F, Maatouk DM & Lovell-Badge R (2018) Sex reversal following deletion of a single far upstream enhancer of Sox9. *Science* 360: 1469–1473

Gonen N, Quinn A, O'Neill HC, Koopman P & Lovell-Badge R (2017) Normal Levels of Sox9 Expression in the Developing Mouse Testis Depend on the TES/TESCO Enhancer, but This Does Not Act Alone. *PLOS Genet* 13: e1006520

Greco TL & Payne AH (1994) Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135: 262–268

Griswold SL & Behringer RR (2009) Fetal Leydig Cell Origin and Development. *Sex Dev* 3: 1–15

Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani A & Wylie C (2009) Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development* 136: 1295–1303

Hacker A, Capel B, Goodfellow P & Lovell-Badge R (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121: 1603–1614

Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortés L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, *et al* (2000) SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 91: 403–407

Harikae K, Miura K, Shinomura M, Matoba S, Hiramatsu R, Tsunekawa N, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, Morohashi K & Kanai Y (2013) Heterogeneity in sexual bipotentiality and plasticity of granulosa cells in developing mouse ovaries. *J Cell Sci* 126: 2834–2844

Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R & Goodfellow PN (1992) DNA Binding Activity of Recombinant SRY from Normal Males and XY Females. *Science* 255: 453–456

Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, Fernandino JI, Somoza GM, Yokota M & Strüssmann CA (2012) A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci* 109: 2955–2959

Hayashi T, Kageyama Y, Ishizaka K, Kihara K & Oshima H (2000) Sexual Dimorphism in the Regulation of Meiotic Process in the Rabbit. *Biol Reprod* 62: 1722–1727

Heikkilä M, Prunskaite R, Naillat F, Itäranta P, Vuoristo J, Leppäluoto J, Peltoketo H & Vainio S (2005) The Partial Female to Male Sex Reversal in Wnt-4-Deficient Females Involves Induced Expression of Testosterone Biosynthetic Genes and Testosterone Production, and Depends on Androgen Action. *Endocrinology* 146: 4016–4023

Hickey G, Chen S, Besman M, Shively J, Hall P, Gaddy-Kurten D & Richards J (1988) Hormonal Regulation, Tissue Distribution, and Content of Aromatase Cytochrome P450 Messenger Ribonucleic Acid and Enzyme in Rat Ovarian Follicles and Corpora Lutea: Relationship to Estradiol Biosynthesis*. *Endocrinology* 122: 1426–1436

Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M, Tsunekawa N, Katoh-Fukui Y, Kurohmaru M, Morohashi K, Wilhelm D, Koopman P & Kanai Y (2009) A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development* 136: 129–138

Hu Y-C, Nicholls PK, Soh YQS, Daniele JR, Junker JP, Oudenaarden A van & Page DC (2015) Licensing of Primordial Germ Cells for Gametogenesis Depends on Genital Ridge Signaling. *PLOS Genet* 11: e1005019

Hu Y-C, Okumura LM & Page DC (2013) Gata4 Is Required for Formation of the Genital Ridge in Mice. *PLOS Genet* 9: e1003629

Huang DW, Sherman BT & Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44–57

Huang W, Zhou X, Lefebvre V & de Crombrugghe B (2000) Phosphorylation of SOX9 by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase A Enhances SOX9's Ability To Transactivate aCol2a1 Chondrocyte-Specific Enhancer. *Mol Cell Biol* 20: 4149–4158

Hughes IA, Houk C, Ahmed SF & Lee PA (2006) Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol* 2: 148–162

Hyon C, Chantot-Bastaraud S, Harbuz R, Bhouri R, Perrot N, Peycelon M, Sibony M, Rojo S, Piguel X, Bilan F, *et al* (2015) Refining the regulatory region upstream of SOX9 associated with 46,XX testicular disorders of Sex Development (DSD). *Am J Med Genet A* 167: 1851–1858

Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA & Parker KL (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 8: 654–662

Inui M, Tamano M, Kato T & Takada S (2017) CRISPR/Cas9-mediated simultaneous knockout of Dmrt1 and Dmrt3 does not recapitulate the 46,XY gonadal dysgenesis observed in 9p24.3 deletion patients. *Biochem Biophys Rep* 9: 238–244

Ioannidis J, Taylor G, Zhao D, Liu L, Idoko-Akoh A, Gong D, Lovell-Badge R, Guioli S, McGrew MJ & Clinton M (2021) Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. *Proc Natl Acad Sci* 118

Irie N, Lee S-M, Lorenzi V, Xu H, Chen J, Inoue M, Kobayashi T, Sancho-Serra C, Drousioti E, Dietmann S, *et al* (2023) DMRT1 regulates human germline commitment. *Nat Cell Biol*: 1–14

Jameson SA, Natarajan A, Cool J, DeFalco T, Maatouk DM, Mork L, Munger SC & Capel B (2012) Temporal Transcriptional Profiling of Somatic and Germ Cells Reveals Biased Lineage Priming of Sexual Fate in the Fetal Mouse Gonad. *PLOS Genet* 8: e1002575

Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B & Swain A (2003) Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* 130: 3663–3670

Jolivet G, Daniel-Carlier N, Harscoët E, Airaud E, Dewaele A, Pierson C, Giton F, Boulanger L, Daniel N, Mandon-Pépin B, *et al* (2022) Fetal Estrogens are not Involved in Sex Determination But Critical for Early Ovarian Differentiation in Rabbits. *Endocrinology* 163: bqab210

Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen X-N, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR & Vilain E (2001) Up-Regulation of WNT-4 Signaling and Dosage-Sensitive Sex Reversal in Humans. *Am J Hum Genet* 68: 1102–1109

Jørgensen A, Nielsen JE, Blomberg Jensen M, Græm N & Rajpert-De Meyts E (2012) Analysis of meiosis regulators in human gonads: a sexually dimorphic spatio-temporal expression pattern suggests involvement of DMRT1 in meiotic entry. *Mol Hum Reprod* 18: 523–534

Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, Suetake H, Suzuki S, Hosoya S, *et al* (2012) A Trans-Species Missense SNP in Amhr2 Is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, Takifugu rubripes (Fugu). *PLOS Genet* 8: e1002798

Karl J & Capel B (1998) Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium. *Dev Biol* 203: 323–333

Kashimada K, Pelosi E, Chen H, Schlessinger D, Wilhelm D & Koopman P (2011) FOXL2 and BMP2 Act Cooperatively to Regulate Follistatin Gene Expression during Ovarian Development. *Endocrinology* 152: 272–280

Kaufmann E & Knöchel W (1996) Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* 57: 3–20

Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH & Koopman P (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 2813–2822

Kim G-J, Sock E, Buchberger A, Just W, Denzer F, Hoepffner W, German J, Cole T, Mann J, Seguin JH, *et al* (2015) Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development. *J Med Genet* 52: 240–247

Kim K-A, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon MA, Liu S, Gros D, Korver W, Yonkovich S, Tomasevic N, *et al* (2008) R-Spondin Family Members Regulate the Wnt Pathway by a Common Mechanism. *Mol Biol Cell* 19: 2588–2596

Kim S, Bardwell VJ & Zarkower D (2007) Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation. *Dev Biol* 307: 314–327

Kim S, Kettlewell JR, Anderson RC, Bardwell VJ & Zarkower D (2003) Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Expr Patterns* 3: 77–82

Kimura T, Yomogida K, Iwai N, Kato Y & Nakano T (1999) Molecular cloning and genomic organization of mouse homologue of Drosophila germ cell-less and its expression in germ lineage cells. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 223–230

Kocer A, Pinheiro I, Pannetier M, Renault L, Parma P, Radi O, Kim K-A, Camerino G & Pailhoux E (2008) R-spondin1 and FOXL2act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation. *BMC Dev Biol* 8: 36

Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N & Lovell-Badge R (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348: 450–452

Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD & Page DC (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci* 103: 2474–2479

Krentz AD, Murphy MW, Kim S, Cook MS, Capel B, Zhu R, Matin A, Sarver AL, Parker KL, Griswold MD, *et al* (2009) The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 22323–22328

Krentz AD, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ & Zarkower D (2011) DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary. *Dev Biol* 356: 63–70

Krentz AD, Murphy MW, Zhang T, Sarver AL, Jain S, Griswold MD, Bardwell VJ & Zarkower D (2013) Interaction between DMRT1 function and genetic background modulates signaling and pluripotency to control tumor susceptibility in the fetal germ line. *Dev Biol* 377: 67–78

Kulibin AYu & Malolina EA (2020) Formation of the rete testis during mouse embryonic development. *Dev Dyn* 249: 1486–1499

Kumar DL & DeFalco T (2018) A perivascular niche for multipotent progenitors in the fetal testis. *Nat Commun* 9: 4519

Kuroiwa A, Handa S, Nishiyama C, Chiba E, Yamada F, Abe S & Matsuda Y (2011) Additional copies of CBX2 in the genomes of males of mammals lacking SRY, the Amami spiny rat (Tokudaia osimensis) and the Tokunoshima spiny rat (Tokudaia tokunoshimensis). *Chromosome Res* 19: 635–644

Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, *et al* (2013) Epigenetic Regulation of Mouse Sex Determination by the Histone Demethylase Jmjd1a. *Science* 341: 1106–1109

Kuure S, Vuolteenaho R & Vainio S (2000) Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev* 92: 31–45

Langmead B & Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9: 357–359

Lau ES-W, Zhang Z, Qin M & Ge W (2016) Knockout of Zebrafish Ovarian Aromatase Gene (cyp19a1a) by TALEN and CRISPR/Cas9 Leads to All-male Offspring Due to Failed Ovarian Differentiation. *Sci Rep* 6: 37357

Lau W de, Peng WC, Gros P & Clevers H (2014) The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev* 28: 305–316

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CVE, Korving JPWFM & Hogan BLM (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13: 424–436

Le Rolle M, Massa F, Siggers P, Turchi L, Loubat A, Koo B-K, Clevers H, Greenfield A, Schedl A, Chaboissier M-C, *et al* (2021) Arrest of WNT/β-catenin signaling enables the transition from pluripotent to differentiated germ cells in mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2023376118

Ledig S, Hiort O, Wünsch L & Wieacker P (2012) Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *Eur J Endocrinol* 167: 119–124

Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T & Bhattacharya SS (2003) Fox's in development and disease. *Trends Genet* 19: 339–344

Lei N & Heckert LL (2002) Sp1 and Egr1 Regulate Transcription of the Dmrt1 Gene in Sertoli Cells1. *Biol Reprod* 66: 675–684

Lei N & Heckert LL (2004) Gata4 Regulates Testis Expression of Dmrt1. *Mol Cell Biol*

Lei N, Hornbaker KI, Rice DA, Karpova T, Agbor VA & Heckert LL (2007) Sex-Specific Differences in Mouse DMRT1 Expression Are Both Cell Type- and Stage-Dependent During Gonad Development1. *Biol Reprod* 77: 466–475

Lei N, Karpova T, Hornbaker KI, Rice DA & Heckert LL (2009) Distinct Transcriptional Mechanisms Direct Expression of the Rat Dmrt1 Promoter in Sertoli Cells and Germ Cells of Transgenic Mice1. *Biol Reprod* 81: 118–125

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079

Li M, Sun Y, Zhao J, Shi H, Zeng S, Ye K, Jiang D, Zhou L, Sun L, Tao W, *et al* (2015) A Tandem Duplicate of Anti-Müllerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, Oreochromis niloticus. *PLOS Genet* 11: e1005678

Li Y, Zheng M & Lau Y-FC (2014) The Sex-Determining Factors SRY and SOX9 Regulate Similar Target Genes and Promote Testis Cord Formation during Testicular Differentiation. *Cell Rep* 8: 723–733

Lima AC, Carvalho F, Gonçalves J, Fernandes S, Marques PI, Sousa M, Barros A, Seixas S, Amorim A, Conrad DF, *et al* (2015) Rare double sex and mab-3-related transcription factor 1 regulatory variants in severe spermatogenic failure. *Andrology* 3: 825–833

Lindeman RE, Gearhart MD, Minkina A, Krentz AD, Bardwell VJ & Zarkower D (2015) Sexual cell-fate reprogramming in the ovary by DMRT1. *Curr Biol CB* 25: 764–771

Lindeman RE, Murphy MW, Agrimson KS, Gewiss RL, Bardwell VJ, Gearhart MD & Zarkower D (2021) The conserved sex regulator DMRT1 recruits SOX9 in sexual cell fate reprogramming. *Nucleic Acids Res* 49: 6144–6164

Lintern-moore S & Moore GPM (1979) The Initiation of Follicle and Oocyte Growth in the Mouse Ovary. *Biol Reprod* 20: 773–778

Liu C, Peng J, Matzuk MM & Yao HH-C (2015) Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nat Commun* 6: 6934

Logan CY & Nusse R (2004) The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781–810

Lopes AM, Aston KI, Thompson E, Carvalho F, Gonçalves J, Huang N, Matthiesen R, Noordam MJ, Quintela I, Ramu A, *et al* (2013) Human Spermatogenic Failure Purges Deleterious Mutation Load from the Autosomes and Both Sex Chromosomes, including the Gene DMRT1. *PLOS Genet* 9: e1003349

Lourenço R, Lopes SS & Saúde L (2010) Left-right function of dmrt2 genes is not conserved between zebrafish and mouse. *PloS One* 5: e14438

Love MI, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 550

Luo X, Ikeda Y & Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481–490

Maatouk DM, Mork L, Chassot A-A, Chaboissier M-C & Capel B (2013) Disruption of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa cells in the perinatal Wnt4 mutant ovary. *Dev Biol* 383: 295–306

Maatouk DM, Natarajan A, Shibata Y, Song L, Crawford GE, Ohler U & Capel B (2017) Genome-wide identification of regulatory elements in Sertoli cells. *Development* 144: 720–730

Machanick P & Bailey TL (2011) MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27: 1696–1697

MacLean G, Li H, Metzger D, Chambon P & Petkovich M (2007) Apoptotic Extinction of Germ Cells in Testes of Cyp26b1 Knockout Mice. *Endocrinology* 148: 4560–4567

Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM & Burgoyne PS (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27: 271–276

Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Méjean C, Berta P, Poulat F & Boizet-Bonhoure B (2005) Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J* 24: 1798–1809

Mamsen LS, Ernst EH, Borup R, Larsen A, Olesen RH, Ernst E, Anderson RA, Kristensen SG & Andersen CY (2017) Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. *Sci Rep* 7: 15961

Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, Okopnik M, Knopf C, Indelman M, Drugan A, Tiosano D, Gershoni-Baruch R, Choder M, *et al* (2008) SERKAL Syndrome: An Autosomal-Recessive Disorder Caused by a Loss-of-Function Mutation in WNT4. *Am J Hum Genet* 82: 39–47

Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R & Capel B (1997) Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* 7: 958–968

Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Fujiwara-Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y & Matsuda M (2012) Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. *Chromosome Res* 20: 163–176

Matson CK, Murphy MW, Griswold MD, Yoshida S, Bardwell VJ & Zarkower D (2010) The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *Dev Cell* 19: 612–624

Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ & Zarkower D (2011) DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476: 101–104

Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, *et al* (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559–563

Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau E, Hamaguchi S, Sakaizumi M & Nagahama Y (2007) DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci* 104: 3865–3870

Mayère C, Neirijnck Y, Sararols P, Rands CM, Stévant I, Kühne F, Chassot A-A, Chaboissier M-C, Dermitzakis ET & Nef S (2021) Single-cell transcriptomics reveal temporal dynamics of critical regulators of germ cell fate during mouse sex determination. *FASEB J* 35: e21452

Mayère C, Regard V, Perea-Gomez A, Bunce C, Neirijnck Y, Djari C, Bellido-Carreras N, Sararols P, Reeves R, Greenaway S, *et al* (2022) Origin, specification and differentiation of a rare supporting-like lineage in the developing mouse gonad. *Sci Adv* 8: eabm0972

Mello MP de, Coeli FB, Assumpção JG, Castro TM, Maciel-Guerra AT, Marques-de-Faria AP, Baptista MTM & Guerra-Júnior G (2010) Novel DMRT1 3'UTR+11insT mutation associated to XY partial gonadal dysgenesis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54: 749–753

Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Frasin LA, Radi O, Parma P, Camerino G & Schwartz RA (2005) Association of palmoplantar keratoderma, cutaneous squamous cell carcinoma, dental anomalies, and hypogenitalism in four siblings with 46,XX karyotype: A new syndrome. *J Am Acad Dermatol* 53: S234–S239

Minkina A, Matson CK, Lindeman RE, Ghyselinck NB, Bardwell VJ & Zarkower D (2014) DMRT1 protects male gonadal cells from retinoid-dependent sexual transdifferentiation. *Dev Cell* 29: 511–520

Mitchell CL & Harley VR (2002) Biochemical defects in eight SRY missense mutations causing XY gonadal dysgenesis. *Mol Genet Metab* 77: 217–225

Mitsunaga K, Araki K, Mizusaki H, Morohashi K-I, Haruna K, Nakagata N, Giguère V, Yamamura K-I & Abe K (2004) Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR-beta results in reduction of germ cell number in mouse embryos. *Mech Dev* 121: 237–246

Mohammed FMA, Farag TI, Gunawardana SS, Al-Digashim DD, Al-Awadi SA, Al-Othman SA & Sundareshan TS (1989) Direct duplication of chromosome 1, dir dup(1)(p21.2 → p32) in a Bedouin boy with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet* 32: 353–355

Molyneaux KA, Stallock J, Schaible K & Wylie C (2001) Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol* 240: 488–498

Moniot B, Berta P, Scherer G, Südbeck P & Poulat F (2000) Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech Dev* 91: 323–325

Montazer-Torbati F, Kocer A, Auguste A, Renault L, Charpigny G, Pailhoux E & Pannetier M (2010) A study of goat SRY protein expression suggests putative new roles for this gene in the developing testis of a species with long-lasting SRY expression. *Dev Dyn* 239: 3324–3335

Moon RT, Kohn AD, Ferrari GVD & Kaykas A (2004) WNT and β-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5: 691–701

Mork L, Maatouk DM, McMahon JA, Guo JJ, Zhang P, McMahon AP & Capel B (2012) Temporal Differences in Granulosa Cell Specification in the Ovary Reflect Distinct Follicle Fates in Mice1. *Biol Reprod* 86: 37, 1–9

Mruk DD & Cheng CY (2015) The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev* 36: 564–591

Munsterberg A & Lovell-Badge R (1991) Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613–624

Murphy MW, Gearhart MD, Wheeler A, Bardwell VJ & Zarkower D (2022) Genomics of sexual cell fate transdifferentiation in the mouse gonad. *G3 GenesGenomesGenetics* 12: jkac267

Murphy MW, Lee JK, Rojo S, Gearhart MD, Kurahashi K, Banerjee S, Loeuille G-A, Bashamboo A, McElreavey K, Zarkower D, *et al* (2015) An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nat Struct Mol Biol* 22: 442–451

Murphy MW, Sarver AL, Rice D, Hatzi K, Ye K, Melnick A, Heckert LL, Zarkower D & Bardwell VJ (2010) Genome-wide analysis of DNA binding and transcriptional regulation by the mammalian Doublesex homolog DMRT1 in the juvenile testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13360–13365

Naillat F, Prunskaite-Hyyryläinen R, Pietilä I, Sormunen R, Jokela T, Shan J & Vainio SJ (2010) Wnt4/5a signalling coordinates cell adhesion and entry into meiosis during presumptive ovarian follicle development. *Hum Mol Genet* 19: 1539–1550

Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, *et al* (2002) A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, Oryzias latipes. *Proc Natl Acad Sci* 99: 11778–11783

Nef S & Parada LF (1999) Cryptorchidism in mice mutant for Insl3. *Nat Genet* 22: 295–299

Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti J-L, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P, *et al* (2005) Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol* 287: 361–377

Nef S, Stévant I & Greenfield A (2019) Chapter Six - Characterizing the bipotential mammalian gonad. In *Current Topics in Developmental Biology*, Capel B (ed) pp 167–194. Academic Press

Nicol B, Grimm SA, Gruzdev A, Scott GJ, Ray MK & Yao HH-C (2018) Genome-wide identification of FOXL2 binding and characterization of FOXL2 feminizing action in the fetal gonads. *Hum Mol Genet* 27: 4273–4287

Niehrs C (2006) Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25: 7469–7481

Niu W & Spradling AC (2020) Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary. *Proc Natl Acad Sci* 117: 20015–20026

Nusse R (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15: 28–32

Oakberg EF (1956) Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 99: 507–516

Oh HJ, Li Y & Lau Y-FC (2005) Sry Associates with the Heterochromatin Protein 1 Complex by Interacting with a KRAB Domain Protein1. *Biol Reprod* 72: 407–415

Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, *et al* (2005) Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436: 207–213

Ohnesorg T, Vilain E & Sinclair AH (2014) The Genetics of Disorders of Sex Development in Humans. *Sex Dev* 8: 262–272

Ottolenghi C & McElreavey K (2000) Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol Genet Metab* 71: 397–404

Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G & Schlessinger D (2005) Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet* 14: 2053–2062

Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T, Cao A, Forabosco A & Schlessinger D (2007) Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet* 16: 2795–2804

Ottolenghi C, Veitia R, Barbieri M, Fellous M & McElreavey K (2000) The human doublesex-related gene, DMRT2, is homologous to a gene involved in somitogenesis and encodes a potential bicistronic transcript. *Genomics* 64: 179–186

Ounap K, Uibo O, Zordania R, Kiho L, Ilus T, Oiglane-Shlik E & Bartsch O (2004) Three patients with 9p deletions including DMRT1 and DMRT2: a girl with XY complement, bilateral ovotestes, and extreme growth retardation, and two XX females with normal pubertal development. *Am J Med Genet A* 130A: 415–423

Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Servel N, Taourit S, Furet J-P, 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

Pamilo P & O'Neill RJ (1997) Evolution of the Sry genes. *Mol Biol Evol* 14: 49–55

Pannetier M, Elzaiat M, Thépot D & Pailhoux E (2012) Telling the Story of XX Sex Reversal in the Goat: Highlighting the Sex-Crossroad in Domestic Mammals. *Sex Dev* 6: 33–45

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

Pannetier M, Renault L, Jolivet G, Cotinot C & Pailhoux E (2005) Ovarian-specific expression of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by a FOXL2 bidirectional promoter. *Genomics* 85: 715–726

Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A & Camerino G (2006) R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38: 1304–1309

Pask AJ, Behringer RR & Renfree MB (2003) Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis – from marsupials to mice. *Cytogenet Genome Res* 101: 229–236

Peng H, Ivanov AV, Oh HJ, Lau Y-FC & Rauscher FJ (2009) Epigenetic Gene Silencing by the SRY Protein Is Mediated by a KRAB-O Protein That Recruits the KAP1 Co-repressor Machinery*. *J Biol Chem* 284: 35670–35680

Pennacchio LA, Bickmore W, Dean A, Nobrega MA & Bejerano G (2013) Enhancers: five essential questions. *Nat Rev Genet* 14: 288–295

Pepling ME & C. Spradling A (1998) Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125: 3323–3328

Pepling ME & Spradling AC (2001) Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Dev Biol* 234: 339–351

Peters H, Levy E & Crone M (1965) Oogenesis in rabbits. *J Exp Zool* 158: 169–179

Pierucci-Alves F, Clark AM & Russell LD (2001) A Developmental Study of the Desert Hedgehog-Null Mouse Testis1. *Biol Reprod* 65: 1392–1402

Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar II, Devlin RH & Donaldson EM (1994) Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J Exp Zool* 270: 255–262

Pitetti J-L, Calvel P, Romero Y, Conne B, Truong V, Papaioannou MD, Schaad O, Docquier M, Herrera PL, Wilhelm D, *et al* (2013) Insulin and IGF1 Receptors Are Essential for XX and XY Gonadal Differentiation and Adrenal Development in Mice. *PLOS Genet* 9: e1003160

Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA & Schimenti JC (1998) Meiotic Prophase Arrest with Failure of Chromosome Synapsis in Mice Deficient for Dmc1, a Germline-Specific RecA Homolog. *Mol Cell* 1: 697–705

Pontiggia A, Rimini R, Harley V r., Goodfellow P n., Lovell-Badge R & Bianchi M e. (1994) Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 13: 6115–6124

Poulain M, Frydman N, Tourpin S, Muczynski V, Souquet B, Benachi A, Habert R, Rouiller-Fabre V & Livera G (2014) Involvement of doublesex and mab-3-related transcription factors in human female germ cell development demonstrated by xenograft and interference RNA strategies. *Mol Hum Reprod* 20: 960–971

Rahmoun M, Lavery R, Laurent-Chaballier S, Bellora N, Philip GK, Rossitto M, Symon A, Pailhoux E, Cammas F, Chung J, *et al* (2017) In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Res* 45: 7191–7211

Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dündar F & Manke T (2016) deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* 44: W160–W165

Rastetter RH, Bernard P, Palmer JS, Chassot A-A, Chen H, Western PS, Ramsay RG, Chaboissier M-C & Wilhelm D (2014) Marker genes identify three somatic cell types in the fetal mouse ovary. *Dev Biol* 394: 242–252

Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ & Zarkower D (1999) Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 215: 208–220

Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ & Zarkower D (2000) Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 14: 2587–2595

Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J & Zarkower D (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691–695

Richardson BE & Lehmann R (2010) Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 37–49

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G & Mesirov JP (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29: 24–26

Roly ZY, Backhouse B, Cutting A, Tan TY, Sinclair AH, Ayers KL, Major AT & Smith CA (2018) The cell biology and molecular genetics of Müllerian duct development. *WIREs Dev Biol* 7: e310

Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L & Wylie C (2006) Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 133: 4861–4869

Saba R, Wu Q & Saga Y (2014) CYP26B1 promotes male germ cell differentiation by suppressing STRA8-dependent meiotic and STRA8-independent mitotic pathways. *Dev Biol* 389: 173–181

Salas-Cortes L, Jaubert F, Barbaux S, Nessmann C, Bono MR, Fellous M, McElreavey K & Rosemblatt M (1999) The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int J Dev Biol* 43: 135–140

Saraste A & Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45: 528–537

Saulnier A, Keruzore M, De Clercq S, Bar I, Moers V, Magnani D, Walcher T, Filippis C, Kricha S, Parlier D, *et al* (2013) The Doublesex Homolog Dmrt5 is Required for the Development of the Caudomedial Cerebral Cortex in Mammals. *Cereb Cortex* 23: 2552–2567

Saunders PTK, Turner JMA, Ruggiu M, Taggart M, Burgoyne PS, Elliott D & Cooke HJ (2003) Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. *Reprod Camb Engl* 126: 589–597

Schmahl J & Capel B (2003) Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev Biol* 258: 264–276

Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL & Capel B (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonadxs. *Development* 127: 65–73

Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier A-C & Treier M (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131: 933–942

Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwasser P, Bardoni B, Cisternino M & Scherer G (1995) Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet* 56: 862–869

Schöler H r., Hatzopoulos A k., Balling R, Suzuki N & Gruss P (1989) A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J* 8: 2543–2550

Sekido R, Bar I, Narváez V, Penny G & Lovell-Badge R (2004) SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* 274: 271–279

Sekido R & Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453: 930–934

Seo KW, Wang Y, Kokubo H, Kettlewell JR, Zarkower DA & Johnson RL (2006) Targeted disruption of the DM domain containing transcription factor Dmrt2 reveals an essential role in somite patterning. *Dev Biol* 290: 200–210

Shen MM & Hodgkin J (1988) mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in C. elegans. *Cell* 54: 1019–1031

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

Simon R, Lischer HEL, Pieńkowska-Schelling A, Keller I, Häfliger IM, Letko A, Schelling C, Lühken G & Drögemüller C (2020) New genomic features of the polled intersex syndrome variant in goats unraveled by long-read whole-genome sequencing. *Anim Genet* 51: 439–448

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf A-M, Lovell-Badge R & Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240–244

Smith CA, Hurley TM, McClive PJ & Sinclair AH (2002) Restricted expression of DMRT3 in chicken and mouse embryos. *Mech Dev* 119 Suppl 1: S73-76

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

Solnica-Krezel L & Sepich DS (2012) Gastrulation: Making and Shaping Germ Layers. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 687–717

Song Y, Liu T, Wang Y, Deng J, Chen M, Yuan L, Lu Y, Xu Y, Yao H, Li Z, *et al* (2017) Mutation of the Sp1 binding site in the 5' flanking region of SRY causes sex reversal in rabbits. *Oncotarget* 8: 38176–38183

Soto-Suazo M, San Martin S & Zorn TMT (2004) Collagen and tenascin-C expression along the migration pathway of mouse primordial germ cells. *Histochem Cell Biol* 121: 149–153

Speed RM (1982) Meiosis in the foetal mouse ovary. *Chromosoma* 85: 427–437

Stévant I, Kühne F, Greenfield A, Chaboissier M-C, Dermitzakis ET & Nef S (2019) Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep* 26: 3272-3283.e3

Stévant I, Neirijnck Y, Borel C, Escoffier J, Smith LB, Antonarakis SE, Dermitzakis ET & Nef S (2018) Deciphering Cell Lineage Specification during Male Sex Determination with Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Rep* 22: 1589–1599

Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, Rogers N, Knower K, Rowley L, Eyre H, *et al* (2011) Identification of *SOX3* as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest* 121: 328–341

Suzuki A & Saga Y (2008) Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev* 22: 430–435

Tanaka SS & Nishinakamura R (2014) Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cell Mol Life Sci* 71: 4781–4802

Terao M, Ogawa Y, Takada S, Kajitani R, Okuno M, Mochimaru Y, Matsuoka K, Itoh T, Toyoda A, Kono T, *et al* (2022) Turnover of mammal sex chromosomes in the Sry-deficient Amami spiny rat is due to male-specific upregulation of Sox9. *Proc Natl Acad Sci* 119: e2211574119

Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM & Orkin SH (2002) Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129: 4627–4634

Tilmann C & Capel B (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Dev Camb Engl* 126: 2883–2890

Toda K, Takeda K, Okada T, Akira S, Saibara T, Kaname T, Yamamura K, Onishi S & Shizuta Y (2001) Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol. *J Endocrinol* 170: 99–111

Tolwinski NS, Wehrli M, Rives A, Erdeniz N, DiNardo S & Wieschaus E (2003) Wg/Wnt Signal Can Be Transmitted through Arrow/LRP5,6 and Axin Independently of Zw3/Gsk3β Activity. *Dev Cell* 4: 407–418

Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, Maggiulli G, Grammatico B, Remotti D, Saccucci P, Valentini F, *et al* (2008) Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum Mutat* 29: 220–226

Tremblay KD, Dunn NR & Robertson EJ (2001) Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* 128: 3609–3621

Tsai C-L, Tsai C-N, Lee Y-S, Wang H-S, Lee L-Y, Lin C-Y, Yang SY & Chao A (2020) Genetic analysis of a Taiwanese family identifies a DMRT3-OAS3 interaction that is involved in human sexual differentiation through the regulation of ESR1 expression. *Fertil Steril* 114: 133–143

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D & Pilia G (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13: 1171–1181

Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier A-C, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, *et al* (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 139: 1130–1142

Ungewitter EK & Yao HH-C (2013) How to Make a Gonad: Cellular Mechanisms Governing Formation of the Testes and Ovaries. *Sex Dev* 7: 7–20

Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N & McMahon AP (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397: 405–409

Veitia R, Nunes M, Brauner R, Doco-Fenzy M, Joanny-Flinois O, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Fellous M & McElreavey K (1997) Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics* 41: 271–274

Vernet N, Condrea D, Mayere C, Féret B, Klopfenstein M, Magnant W, Alunni V, Teletin M, Souali-Crespo S, Nef S, *et al* (2020) Meiosis occurs normally in the fetal ovary of mice lacking all retinoic acid receptors. *Sci Adv* 6: eaaz1139

Vialard F, Ottolenghi C, Gonzales M, Choiset A, Girard S, Siffroi J, McElreavey K, Vibert-Guigue C, Sebaoun M, Joye N, *et al* (2002) Deletion of 9p associated with gonadal dysfunction in 46,XY but not in 46,XX human fetuses. *J Med Genet* 39: 514–518

Vidal VPI, Chaboissier M-C, de Rooij DG & Schedl A (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28: 216–217

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, *et al* (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79: 1111–1120

Wang D-S, Zhou L-Y, Kobayashi T, Matsuda M, Shibata Y, Sakai F & Nagahama Y (2010) Doublesex- and Mab-3-Related Transcription Factor-1 Repression of Aromatase Transcription, a Possible Mechanism Favoring the Male Pathway in Tilapia. *Endocrinology* 151: 1331–1340

Wang S, Wang X, Ma L, Lin X, Zhang D, Li Z, Wu Y, Zheng C, Feng X, Liao S, *et al* (2016) Retinoic Acid Is Sufficient for the In Vitro Induction of Mouse Spermatocytes. *Stem Cell Rep* 7: 80–94

Warr N, Carre G-A, Siggers P, Faleato JV, Brixey R, Pope M, Bogani D, Childers M, Wells S, Scudamore CL, *et al* (2012) Gadd45γ and Map3k4 Interactions Regulate Mouse Testis Determination via p38 MAPK-Mediated Control of Sry Expression. *Dev Cell* 23: 1020–1031

Wartenberg H, Kinsky I, Viebahn C & Schmolke C (1991) Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *J Electron Microsc Tech* 19: 133–157

Wei Y, Yang D, Du X, Yu X, Zhang M, Tang F, Ma F, Li N, Bai C, Li G, *et al* (2020) Interaction between DMRT1 and PLZF protein regulates self-renewal and proliferation in male germline stem cells. *Mol Cell Biochem*

Wieacker P, Missbach D, Jakubiczka S, Borgmann S & Albers N (1996) Sex reversal in a child with the karyotype 46, XY, dup (1) (p22.3p32.3). *Clin Genet* 49: 271–273

Wilhelm D & Englert C (2002) The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev* 16: 1839–1851

Wilhelm D, Martinson F, Bradford S, Wilson MJ, Combes AN, Beverdam A, Bowles J, Mizusaki H & Koopman P (2005) Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol* 287: 111–124

Xu H, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GTJ & McKay MJ (2005) Absence of Mouse REC8 Cohesin Promotes Synapsis of Sister Chromatids in Meiosis. *Dev Cell* 8: 949–961

Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, Yamanaka K, Ohinata Y & Saitou M (2008) Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* 40: 1016–1022

Yao HHC, Matzuk MM, Jorgez CJ, Menke DB, Page DC, Swain A & Capel B (2004) Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 230: 210–215

Yao HH-C, Whoriskey W & Capel B (2002) Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 16: 1433–1440

Yeh S, Tsai M-Y, Xu Q, Mu X-M, Lardy H, Huang K-E, Lin H, Yeh S-D, Altuwaijri S, Zhou X, *et al* (2002) Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci* 99: 13498–13503

Ying Y, Liu X-M, Marble A, Lawson KA & Zhao G-Q (2000) Requirement of Bmp8b for the Generation of Primordial Germ Cells in the Mouse. *Mol Endocrinol* 14: 1053–1063

Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y & Morita T (1998) The Mouse RecA-like Gene Dmc1 Is Required for Homologous Chromosome Synapsis during Meiosis. *Mol Cell* 1: 707–718

Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T & Nabeshima Y (2006) The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 133: 1495–1505

Yoshimoto S, Ikeda N, Izutsu Y, Shiba T, Takamatsu N & Ito M (2010) Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of Xenopus laevis: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. *Development* 137: 2519–2526

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T & Ito M (2008) A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in Xenopus laevis. *Proc Natl Acad Sci* 105: 2469–2474

Young JM & McNeilly AS (2010) Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 140: 489–504

Zhang F-L, Feng Y-Q, Wang J-Y, Zhu K-X, Wang L, Yan J-M, Li X-X, Wang J-J, Ge W, De Felici M, *et al* (2023) Single cell epigenomic and transcriptomic analysis uncovers potential transcription factors regulating mitotic/meiotic switch. *Cell Death Dis* 14: 1–12

Zhang S, Cao X, Li Y, Wang K, Yuan M & Lan X (2020) Detection of polled intersex syndrome (PIS) and its effect on phenotypic traits in goats. *Anim Biotechnol* 31: 561–565

Zhang S & Cui W (2014) Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells* 6: 305–311

Zhang T, Murphy MW, Gearhart MD, Bardwell VJ & Zarkower D (2014) The mammalian Doublesex homolog DMRT6 coordinates the transition between mitotic and meiotic developmental programs during spermatogenesis. *Dev Camb Engl* 141: 3662–3671

Zhang T, Oatley J, Bardwell VJ & Zarkower D (2016) DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment. *PLoS Genet* 12: e1006293

Zhang T & Zarkower D (2017) DMRT proteins and coordination of mammalian spermatogenesis. *Stem Cell Res* 24: 195–202

Zhang X, Li M, Ma H, Liu X, Shi H, Li M & Wang D (2017) Mutation of foxl2 or cyp19a1a Results in Female to Male Sex Reversal in XX Nile Tilapia. *Endocrinology* 158: 2634–2647

Zhao J, Lu P, Wan C, Huang Y, Cui M, Yang X, Hu Y, Zheng Y, Dong J, Wang M, *et al* (2021) Cell-fate transition and determination analysis of mouse male germ cells throughout development. *Nat Commun* 12: 6839

Zhao L, Svingen T, Ng ET & Koopman P (2015) Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of Dmrt1. *Dev Camb Engl* 142: 1083–1088

ANNEXES

Annexe 1

Absence of Testicular Estrogen Leads to Defects in Spermatogenesis and Increased Semen Abnormalities in Male Rabbits

Aurélie Dewaele, **Emilie Dujardin,** Marjolaine André, Audrey Albina, Hélène Jammes, Frank Giton, Eli Sellem, Geneviève Jolivet, Eric Pailhoux, Maëlle Pannetier

Genes 2022 13, 2070

genes

MDPI

Article

Absence of Testicular Estrogen Leads to Defects in Spermatogenesis and Increased Semen Abnormalities in Male Rabbits

Aurélie Dewaele [1,2], Emilie Dujardin [1,2], Marjolaine André [1,2], Audrey Albina [1,2], Hélène Jammes [1,2], Frank Giton [3,4], Eli Sellem [1,2], Geneviève Jolivet [1,2], Eric Pailhoux [1,2,†] and Maëlle Pannetier [1,2,*,†]

1 Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, 78350 Jouy-en-Josas, France
2 École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, 94700 Maisons-Alfort, France
3 APHP, Pôle Biologie-Pathologie Henri Mondor, 94040 Créteil, France
4 INSERM IMRB U955, 94010 Créteil, France
* Correspondence: maelle.pannetier@inrae.fr
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Estrogens are steroid hormones produced by the aromatization of androgens by the aromatase enzyme, encoded by the *CYP19A1* gene. Although generally referred to as "female sex hormones", estrogen is also produced in the adult testes of many mammals, including humans. To better understand the function of estrogens in the male, we used the rabbit model which is an important biomedical model. First, the expression of *CYP19A1* transcripts was localized mainly in meiotic germ cells. Thus, testicular estrogen appears to be produced inside the seminiferous tubules. Next, the cells expressing *ESR1* and *ESR2* were identified, showing that estrogens could exert their function on post-meiotic germ cells in the tubules and play a role during sperm maturation, since *ESR1* and *ESR2* were detected in the *cauda* epididymis. Then, CRISPR/Cas9 *CYP19A1*$^{-/-}$ genetically modified rabbits were analyzed. *CYP19A1*$^{-/-}$ males showed decreased fertility with lower sperm count associated with hypo-spermatogenesis and lower spermatid number. Germ/sperm cell DNA methylation was unchanged, while sperm parameters were affected as *CYP19A1*$^{-/-}$ males exhibited reduced sperm motility associated with increased flagellar defects. In conclusion, testicular estrogens could be involved in the spermatocyte–spermatid transition in the testis, and in the acquisition of sperm motility in the epididymis.

Keywords: *CYP19A1* knock-out; male fertility; testicular estrogens; epididymis; spermatogenesis; sperm maturation; DNA methylation

check for updates

Citation: Dewaele, A.; Dujardin, E.; André, M.; Albina, A.; Jammes, H.; Giton, F.; Sellem, E.; Jolivet, G.; Pailhoux, E.; Pannetier, M. Absence of Testicular Estrogen Leads to Defects in Spermatogenesis and Increased Semen Abnormalities in Male Rabbits. *Genes* **2022**, *13*, 2070. https://doi.org/10.3390/genes13112070

Academic Editors: Zissis Mamuris and Maria-Anna Kyrgiafini

Received: 10 October 2022
Accepted: 26 October 2022
Published: 8 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Sex steroids are key reproductive system hormones in both sexes. Estrogens have always been considered the female sex steroid hormones and androgens as their male counterparts. This simplistic assessment remains accurate in different species of vertebrate and for several developmental pathways such as ovarian development in non-mammalian species in which estrogen plays a key role [1–5] or in the differentiation of internal and external male genitalia of mammals for androgens [6]. However, it has been clear for many decades that the situation is more complex; on the one hand because the synthesis of estrogens is made from androgens, thus implying the presence, at least transitory, of androgens in females, and on the other hand because estrogens are also produced by the testes of mammals where their roles remain to be elucidated (for review see [7]).

Cytochrome P450 aromatase, encoded by the *CYP19A1* gene, is responsible for the irreversible conversion of androgens to estrogens. This enzyme is expressed in the adult testes in mammals, but its cellular localization is highly variable depending on the species and the laboratory of analyses (for review see [8]). Initially, the aromatase expression was

described in Leydig cells in rats [9], pigs [10], stallions [11] or humans [12]. Its expression in Sertoli cells was also observed in immature rat testes [13] and aromatase was finally described in meiotic and post-meiotic germ cells of mice [14], rats [9] and humans [15]. Some studies even detected its expression in spermatozoa in pigs [16] and humans [15].

To promote their actions, estrogens are known to use two nuclear receptors ERα/ESR1 and ERβ/ESR2, resulting in genomic effects; and a G-protein-coupled seven-transmembrane receptor (GPER, G-Protein Estrogen coupled Receptor) causing rapid non-genomic effects. On the base of the literature, ERs expression can be detected in all testicular cell types although the results often differ between species and studies (reviewed in details by [17]). For example, in the human testis, ESR1 expression has been described in Leydig cells [18], or in spermatogonia, spermatocytes and round spermatids [19], or in Leydig, Sertoli and germ cells [20]. This variability of results can be explained by the existence of ER variants (spliced isoforms [21]), other proteins that share homology with classical ER, or by the methodologies and antibodies used.

The importance of estrogen signaling in the male fertility has been indicated by the adverse effects of estrogen-like compounds and their interaction with estrogen receptors, which have been shown to cause pathologies. In rats, nuclear receptor overstimulation experiments revealed the presumed role of estrogens in spermatogenesis. Treatment with an ESR1 agonist impaired the formation of elongated spermatids, while administration of an ESR2 agonist induced spermatocyte apoptosis and spermiation failure both leading to reduced sperm count [22]. In addition, overexposure to estrogen during spermatogenesis resulted in epigenetic defects in sperm, such as increased histone retention (ESR1 agonist) and decreased DNA methylation (ESR2 agonist) [23,24].

On the other hand, gene modification experiments carried out in mice tend to show that estrogens, in the testes and male genital tract, act mainly via the ESR1 receptor. Indeed, data on ESR2 functions in the male tract are still controversial in mice, since some showed normal *Esr2*$^{-/-}$ male fertility [25], while others described infertility of unknown origin [26]. In addition, mice deficient for the membrane receptor (*Gper*$^{-/-}$) are fertile and show no particular phenotype [27]. On the contrary, a complete infertility was described in male *Esr1*$^{-/-}$ [28]. Early in their reproductive life, *Esr1*$^{-/-}$ males showed testes with disorganized seminiferous epithelium and dilated lumen. While sperm counts were normal in *Esr1*$^{-/-}$ males, spermatozoa presented reduced motility (flagellar defects) [28–30] and were ineffective in in vitro fertilization (premature acrosomal reaction in mutants) [28,30]. The latter phenotypes appeared to be related to epididymal dysfunctions, and alterations of the epididymal fluid milieu were observed in *Esr1*$^{-/-}$ mice [29].

Genetic modifications or mutations affecting estrogen production have also been reported. In mice, in the absence of aromatase in males (*Cyp19a1*$^{-/-}$ or ArKO), normal testicular morphology was observed up to 14 weeks, with no signs of infertility. Then, a progressive alteration of spermiogenesis was reported, leading to an increase in apoptosis of round spermatids and degeneration of the seminiferous epithelium: the ArKO mice became infertile with advancing age [31,32]. In humans, aromatase mutations are extremely rare conditions. In these patients, there are no consistent findings regarding the testicular phenotype (review in [33]). Nevertheless, when semen collection could be done, oligo-azoospermia and reduced sperm motility were observed [34,35].

The rabbit is an important biomedical model that could help to better understand the function of this testicular estrogen production for spermatogenesis. Thus, we first described *CYP19A1*, *ESR1* and *ESR2* expression in the testis and epididymis of adult rabbits. We showed that estrogens are exclusively produced by germ cells, mainly pachytene spermatocytes. Both *ESR1* and *ESR2* were expressed by round spermatids. Additionally, these receptors were detected in the epididymis, mainly the *cauda*, where estrogen could be measured. Then, taking advantage of the *CYP19A1* mutant rabbit model created by our laboratory [36], we investigated the effects of estrogen deprivation on testes and sperm production in this species. First, a slight decrease in fertility was observed in homozygous mutant males. Then, abnormalities of the seminiferous epithelium were observed, which

were related to impaired spermatogenesis and led to a lower sperm count. Finally, sperm motility was affected and sperm morphological abnormalities were increased in mutant males suffering from estrogen deprivation.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

New Zealand rabbits (NZ1777, Hypharm, Rousssay, France) were bred at the SAAJ rabbit facility (Jouy-en-Josas, France). All experiments were performed with the approval of the French Ministry MENESR (accreditation number APAFIS#6775-2016091911407980 vI) following the recommendation given by the local committee for ethic in animal experimentation (COMETHEA, Jouy-en-Josas). All researchers working directly with the animals possessed an animal experimentation license delivered by the French veterinary services. Three independent lines of *CYP19A1* mutant rabbits have been generated [36], and two of them were used in this study, since no phenotypical differences were observed.

From sexual maturity (6 months), heterozygous *CYP19A1*$^{+/-}$ and homozygous *CYP19A1*$^{-/-}$ males were mated with heterozygous *CYP19A1*$^{+/-}$ females, while control males and females were mated together. The number of mating with or without birth per male, as well as the number of pups per litter was monitored.

2.2. Histological and Immunohistological Analyses

Immediately after sampling, pieces of adult testes were immersed in Bouin's fixative or paraformaldehyde (4% PFA in PBS 1×), fixed for 72 h then paraffin embedded. Microtome sections of 5 µm thickness were processed. Periodic Acid Schiff (PAS) colorations were performed by the @Bridge platform (INRAE, Jouy-en-Josas, France) using an automatic Varistain Slide Stainer (Thermo Fisher Scientific, France).

In situ hybridization (ISH) was performed using the RNAscope ISH methodology (ACD, Bio-Techne SAS, Rennes, France) as previously described [36]. The *CYP19A1*, *ESR1* and *ESR2* probes that were used were those published previously [36]. Hybridization was performed on 5µm sections from PFA fixed tissue using labelling kits (RNAscope 2.5HD assay-brown (conjugated to horse radish peroxidase)) as recommended by the manufacturer. Hybridization was considered as positive when at least one dot was observed in one cell. All colored sections (visible) were scanned using a 3DHISTECH panoramic scanner at the @Bridge platform (INRAE, Jouy-en-Josas, France).

Immunofluorescence was performed on rehydrated sections, where epitope retrieval was performed with citrate-based unmasking solution in a pressure cooker. DNA was then denatured 15 min with HCl 2N, and sections were permeabilized by incubation with 0.5% Triton, 1% BSA for 1h30. After an overnight incubation at 4 °C with the primary antibodies (anti-5mC, Eurogentec, ref BI-MECY-0100, 1/500; anti-5hmC, Active Motif, ref 39569, 1/500), and a 1-h incubation at room temperature with secondary antibodies (Dylight 488 anti-mouse, KPL, ref 072-03-18-06, 1/200; anti-rabbit AlexaFluor 488, Life Technologies, ref A21441, 1/200), slides were mounted in Vectashield mounting medium (Vector, Eurobio Scientific, France) containing DAPI and images were acquired with a DP50 CCD camera (Olympus, France).

2.3. RNA Extraction and RT-qPCR Analyses

The testis and epididymis (head and cauda) from adult rabbits were collected and immediately frozen at −80 °C. Total RNA from each sample was extracted using the RNeasy® MicroKit (Qiagen, France). Quantitative PCR was performed on reverse transcribed RNAs (High-Capacity Reverse cDNA Transcription kit with the included set of random primers, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, France). Based on the output of the GeNorm program, we used *H2AFX*, *YWHAZ* and *SF1* (*Splicing Factor 1*) as the reference genes for this study (Table 1). The results were analyzed with qBase Software (qbase+, Biogazelle, France) [37].

Table 1. Primers used by RT-qPCR.

Gene Name	Forward Primer	Reverse Primer
H2AFX	ACCTGACGGCCGAGATCCT	CGCCCAGCAGCTTGTTGAG
YWHAZ	GGGTCTGGCCCTTAACTTCTCT	AGCAATGGCTTCATCAAAAGC
SF1	GCTTCCGACTGCAAATTCCA	TCACCCAGTTCAGCCATGAG
CYP19A1	GGAAGAATGCATCGACTTGAGTT	GGGCCCAAAACCAAATGGT
ESR1	TCCTCATCCTCTCCCACATC	AGCATCTCCAGCAACAGGTC
ESR2	CTCACCAAGCTGGCTGACAA	AGAGGCGCACTTGGTCCAA
SYCP3	AAAAGAAATGGCCATGTTGCA	GAGTCATCAAAGTAACACGGATTGAA
PRM1	CCAGAGGCGAAGAGTCAGGAA	TCTGGTGGGTCTGCTGTTCTGT

2.4. Measurement of Estradiol, Testosterone and DHEA Hormone Levels in Testis and Epididymis of Adult Rabbits

Estradiol, testosterone and DHEA were assayed by GC/MS according to the protocol described by [38] with modifications [39]. Sample extraction and purification, derivatization and determination of steroid levels in testes and epididymides from adult rabbits are described in [36] or can be provided upon request.

2.5. Semen Collection and Sperm Parameter Analyses (CASA)

Semen of rabbits from the different genotypes were collected using a specially designed artificial vagina. Two successive samplings were performed when possible for each animal. The ejaculate volume was estimated by pipetting and sperm was then immediately diluted in GALAP media (IMV Technologies, France) which was specifically designed for the conservation of rabbit semen. Each diluted sample was incubated 10 min at 37 °C before analyzing sperm parameters using a CASA Hamilton Thorne IVOS II (Hamilton Thorne, France) device with the ×10 objective.

2.6. Luminometric Methylation Assay (LUMA)

DNA extraction from sperm samples was performed as described in [40]. Global DNA methylation levels were quantified using LUMA [41]. Briefly, 1 µg of genomic DNA was cleaved using the isoschizomers HpaII (methylation sensitive) and MspI (non-methylation-sensitive) in two separate reactions and in the presence of EcoRI to standardize for DNA amounts (New England Biolabs, France). The protruding ends were then used as templates for pyrosequencing with the Pyromark Q24 device and Pyromark Gold Q96 reagents (Qiagen). The luminometric signals produced by either the sequential incorporation of C and G nucleotides (reflecting the number of CCGG sites digested by HpaII or MspI) or the sequential incorporation of A and T nucleotides (reflecting the number of AATT sites digested by EcoRI), were then quantified using Pyromark Q24 software (Qiagen, France). Each sample was assayed in duplicate.

The global methylation percentage per sample was then calculated as follows:
Methylation% = [100 − (Average signal obtained with HpaII after EcoRI normalization/Average signal obtained with MspI after EcoRI normalization)] × 100

2.7. Statistics

The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Because of the small number of samples in groups, comparisons between values were made by the Mann–Whitney test for non-parametric values. A probability lower than 0.05 was required for significance.

3. Results

3.1. Localization of CYP19A1/Aromatase and ESRs Expression in the Rabbit Testis and Epididymis

To decipher which testicular cell type expressed the *CYP19A1* gene and thus, were able to produce estrogens, we carried on in situ hybridization by using the RNAscope technology, giving reproducible results on rabbit gonads [36] (Figure 1). Aromatase expression

was detected inside the seminiferous tubules, mainly in germ cells with a large nucleus and which seemed to correspond to pachytene spermatocytes (Figure 1A). In addition, to determine which cell types could respond to estrogens in the seminiferous compartment, probes corresponding to estrogen receptors *ESR1* and *ESR2* were used. The expression of both estrogen receptor mRNAs was attested into the seminiferous tubules and was restricted to the round spermatids, with a stronger labelling for *ESR1* (Figure 1B).

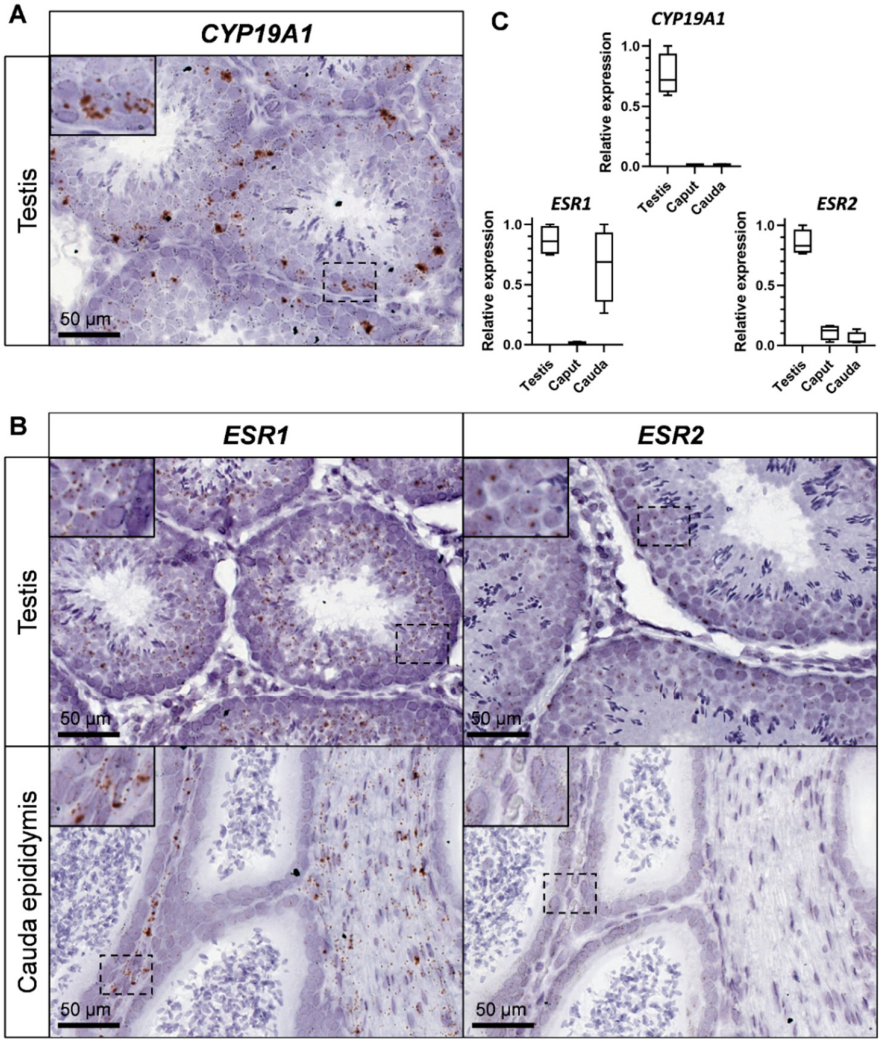


Figure 1. *CYP19A1* and estrogen receptors expression in the testis and epididymis of adult rabbits. (**A**) Location of *CYP19A1* expression by in situ hybridization (RNAscope technology) in the adult testis. (**B**) Location of *ESR1* and *ESR2* expression by in situ hybridization in the testis and the cauda epididymis. (**C**) Relative expression levels of *CYP19A1, ESR1* and *ESR2* analyzed by RT-qPCR in the adult testis and epididymis (caput and cauda). Testis n = 4; Epididymis n = 4.

The expression level of both aromatase and estrogen receptors transcripts was studied and compared within testes and epididymides (*caput* and *cauda*) by RT-qPCR (Figure 1C). Although *CYP19A1* expression was restricted to the testis, *ESR1* expression was strongly detected in the testis and in the tail of the epididymis (*cauda*). *ESR2* expression was also observed in testes, and was faintly detected in both the head and the tail of the epididymis. However, in situ hybridization failed to detect *ESR2* (or *ESR1*) expression in the *caput* epididymis (Figure 1B). On the contrary, strong staining was obtained in the mesenchyma with *ESR1* probe and a faint staining for *ESR2* in the epithelial cells of the *cauda* epididymis.

3.2. CYP19A1 Gene-Targeting in Rabbits Efficiently Suppresses Testicular Estrogen Secretion

We have previously established three strains of genetically modified rabbits carrying deletions of exon 2 (including the initiator ATG codon) of the *CYP19A1* gene. These rabbit strains were initially created to evaluate the role of fetal estrogens produced by early developing ovaries (i.e.,: before meiosis initiation in the germinal lineage) in a non-rodent mammalian species [36]. To confirm that knocking out *CYP19A1* in male really led to testicular estrogen deprivation, we measured estrogen concentrations in *CYP19A1*$^{-/-}$ testes in comparison with wild type ones (Figure 2A). As expected, consistent with estrogen assays performed for their female counterparts [36], no testicular estrogen remained detectable in mutant gonads compared to wild type ones where the median 17β-Estradiol value was about 55 pg/g of tissue. Even if testicular estrogen production was abolished, testosterone and dehydroepiandrosterone (DHEA) concentrations remained similar between mutant and wild type testes with, respectively, around 9 ng/g and 40 ng/g (median values) in each condition (Figure 2A). These results confirm that the deletions engineered on *CYP19A1* exon 2 in the three rabbit lines efficiently suppressed aromatase activity and estrogen secretion as previously demonstrated in females [36].

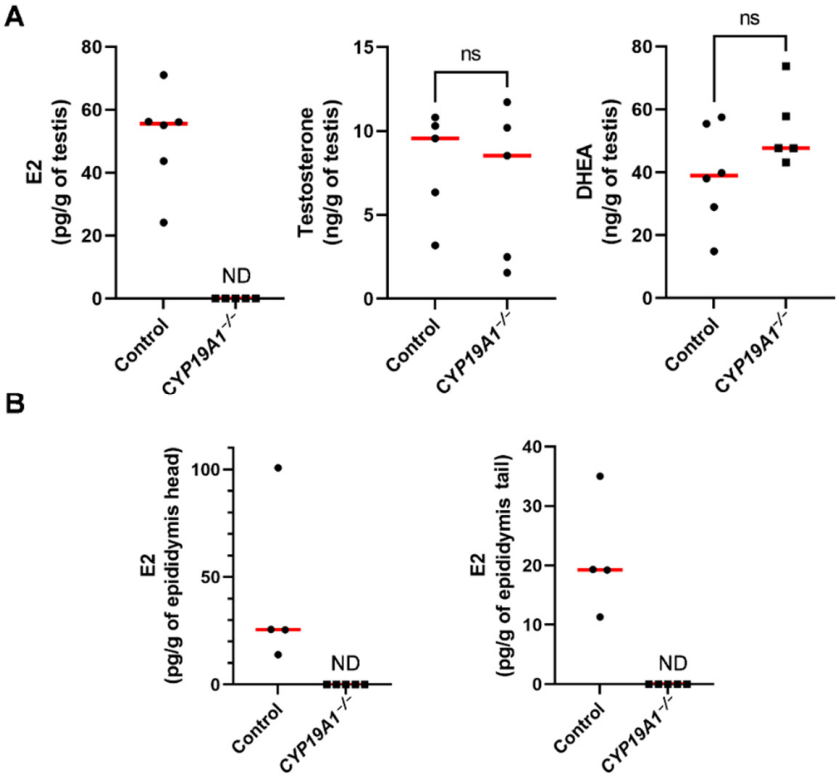


Figure 2. Steroid levels in the testis and epididymis in adults. (**A**) Dosage of 17β-estradiol (E2), testosterone and DHEA concentrations in control and *CYP19A1*$^{-/-}$ adult testes by GC/MS. (**B**) Dosage of 17β-estradiol (E2) in the head and the tail of epididymis. Control n = 4 to 6; *CYP19A1*$^{-/-}$ n = 5. The median is shown in red. ND: not detected. Mann–Whitney test: p-value < 0.05. ns: non-significant.

We have previously shown that estrogens are produced in the seminiferous tubules. Due to the presence of the blood-testis barrier, estrogens were expected to circulate through the efferent ducts and epididymides. 17β-Estradiol levels were thus measured in the epididymides, showing 25 pg/g and 20 pg/g as median values in the head and the tail of the epididymis, respectively (Figure 2B). No estrogen could be detected in *CYP19A1* homozygous mutant epididymides.

3.3. CYP19A1 Knockout Male Rabbits Show Subfertility Parameters

During our previous study on *CYP19A1*$^{-/-}$ fetal ovary [36], spanning 8 years, *CYP19A1* genetically modified male rabbits from three different strains were mated with heterozygous females (*CYP19A1*$^{+/-}$) to expand the lines and produce biological materials. Either heterozygous carrier males (XY *CYP19A1*$^{+/-}$) or homozygous mutant males (XY *CYP19A1*$^{-/-}$) were used. Interestingly, a slight subfertility of homozygous mutant males compared to heterozygous carrier ones was observed on two recorded parameters. First, the percentage of mating without birth was increased when using homozygous mutant males (58.9%) compared to heterozygous carrier males (32.3%) or control rabbits (35.5%) (Figure 3A). Secondly, when mating was successful, the recorded litter size was statistically reduced, as the number of pups per litter dropped from 7.9 (± 3.3) to 6 (± 2.8) by using heterozygous or homozygous mutant males, respectively (Figure 3B,C).

A

	Control males x Control females	*CYP19A1*$^{+/-}$ males x *CYP19A1*$^{+/-}$ females	*CYP19A1*$^{-/-}$ males x *CYP19A1*$^{+/-}$ females
Matings with birth	20 (**64.5%**)	44 (**67.7%**)	58 (**41.1%**)
Matings without birth	11 (**35.5%**)	21 (**32.3%**)	83 (**58.9%**)
Total number of matings	31	65	141

B

	Control males x Control females	*CYP19A1*$^{+/-}$ males x *CYP19A1*$^{+/-}$ females	*CYP19A1*$^{-/-}$ males x *CYP19A1*$^{+/-}$ females
Number of different males	10	13	18
Number of different females	13	25	38
Total number of litters	20	44	58
Total number of pups	156	349	349
Average number of pups per litter	**7.8 ± 2.5**	**7.9 ± 3.3**	**6 ± 2.8**

C

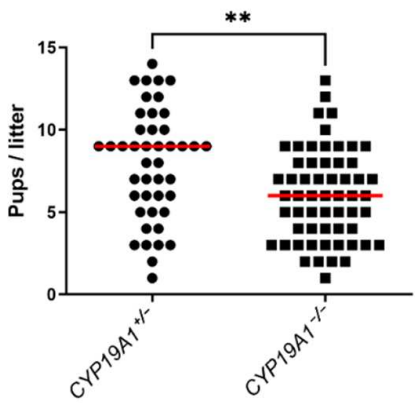


Figure 3. Effect of the *CYP19A1* gene knock-out on the male fertility. (**A**) Number of successful and unsuccessful mating, depending on the genotype of the parents. (**B**) Number of different males and females used and pups per litter depending on the genotype. (**C**) Number of pups per litter obtained by crossing heterozygous females with heterozygous (*CYP19A1*$^{+/-}$) or homozygous (*CYP19A1*$^{-/-}$) males. The median is shown in red. Mann–Whitney test: ** $p < 0.01$.

3.4. Absence of Testicular Estrogens Leads to Spermatogenesis Defects

The effects of estrogen deficiency on testicular morphogenesis and function were evaluated in 2- to 3-year-old rabbits. Histological analyses of the testes showed some abnormal seminiferous tubules in the homozygous mutants (Figure 4A–F). These were found clustered in a few testicular lobules or scattered through the testis (Figure 4C and D and Figure 4E and F, respectively). In these abnormal tubules, the thickness of the seminiferous epithelium was reduced, and the lumen appeared larger: a drastic decrease in the spermatid layer was observed.

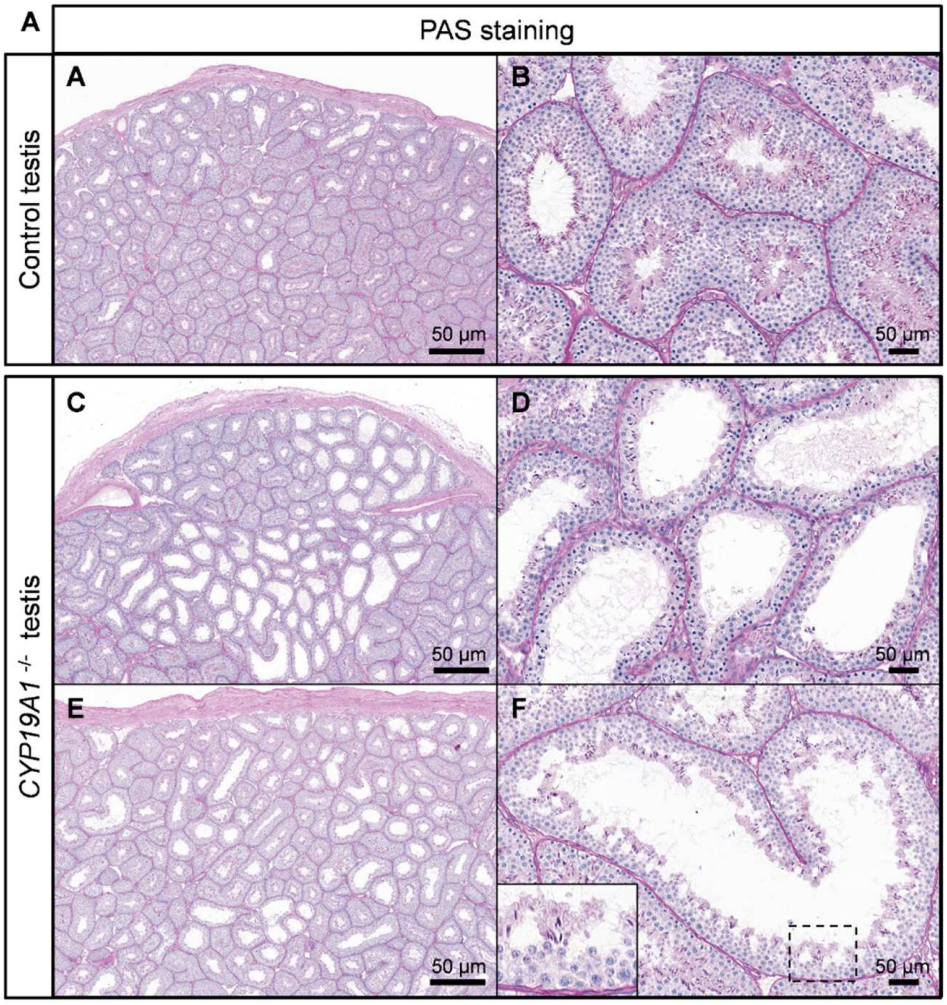


Figure 4. Spermatogenesis defects in absence of estrogen production. (**A**,**B**) PAS staining on control testis. (**C**,**F**) PAS staining on *CYP19A1*$^{-/-}$ testis from two different rabbits (**C**–**F**). Males are 2 to 3 years old.

The expression levels of the markers of spermatocytes I (*SYCP3*) and spermatids (*PRM1*, *Protamine 1*) were evaluated and indeed showed that the fraction of spermatids could be affected in the mutants because the mRNA levels of *PRM1* were diminished (p-Value = 0.02) (Figure 5A,B). Consistent with spermatogenesis abnormalities, testis to body weight ratio was found to be significantly lower in *CYP19A1*$^{-/-}$ males compared to control ones (Figure 5C). In addition, total sperm number was estimated using the IVOS II CASA system (computer assisted sperm analysis), showing that the sperm count was significantly decreased in absence of estrogen synthesis (Figure 5D).

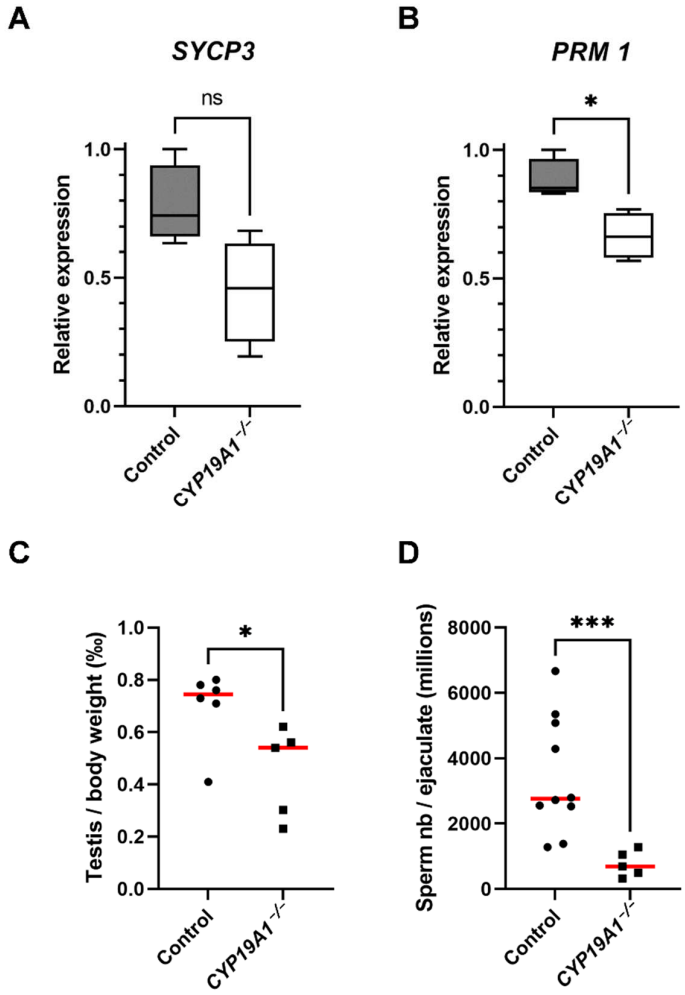


Figure 5. Hypo-spermatogenesis in *CYP19A1*$^{-/-}$ males. (**A**,**B**) RT-qPCR analyses of mRNA levels of *SYCP3* and *PRM1* in control and *CYP19A1*$^{-/-}$ adult testis (n = 5 for each genotype). (**C**) Testis on body weight ratio in control and *CYP19A1*$^{-/-}$ rabbits. Control, n = 6; *CYP19A1*$^{-/-}$ n = 5. The median is shown in red. (**D**) Total sperm counts per million per ejaculated sample in control and *CYP19A1*$^{-/-}$ rabbits. Control, n = 10; *CYP19A1*$^{-/-}$ n = 5. Dots represent the average of two successive semen collections per animal. For *CYP19A1*$^{-/-}$ rabbits, three sets of two successive ejaculations were collected over a one-year interval. The median is shown in red. Mann–Whitney test: * *p*-value < 0.05. *** *p*-Value < 0.0005. ns: non-significant.

3.5. Absence of Testicular Estrogens Has No Impact on Germ Cell DNA Methylation

Since estrogen receptor over activation has been linked to epigenetic modifications [24], we were interested in the DNA methylation of germ cells. Nevertheless, immunofluorescence studies of the deposition of 5-methyl Cytosine (DNA methylation) or the 5-hydroxymethyl Cytosine (DNA hydroxymethylation, i.e., DNA demethylation) showed no difference between control and *CYP19A1*$^{-/-}$ testes (Figure 6A). In addition, the DNA methylation rate of ejaculated sperm was determined by luminometric methylation assay (LUMA). The percentage of DNA methylation, around 70%, was found identical between sperm from control and mutant rabbits (Figure 6B), suggesting that if estrogen plays a role in epigenetics of the male gamete, this might not have been detected by global DNA methylation assessment.

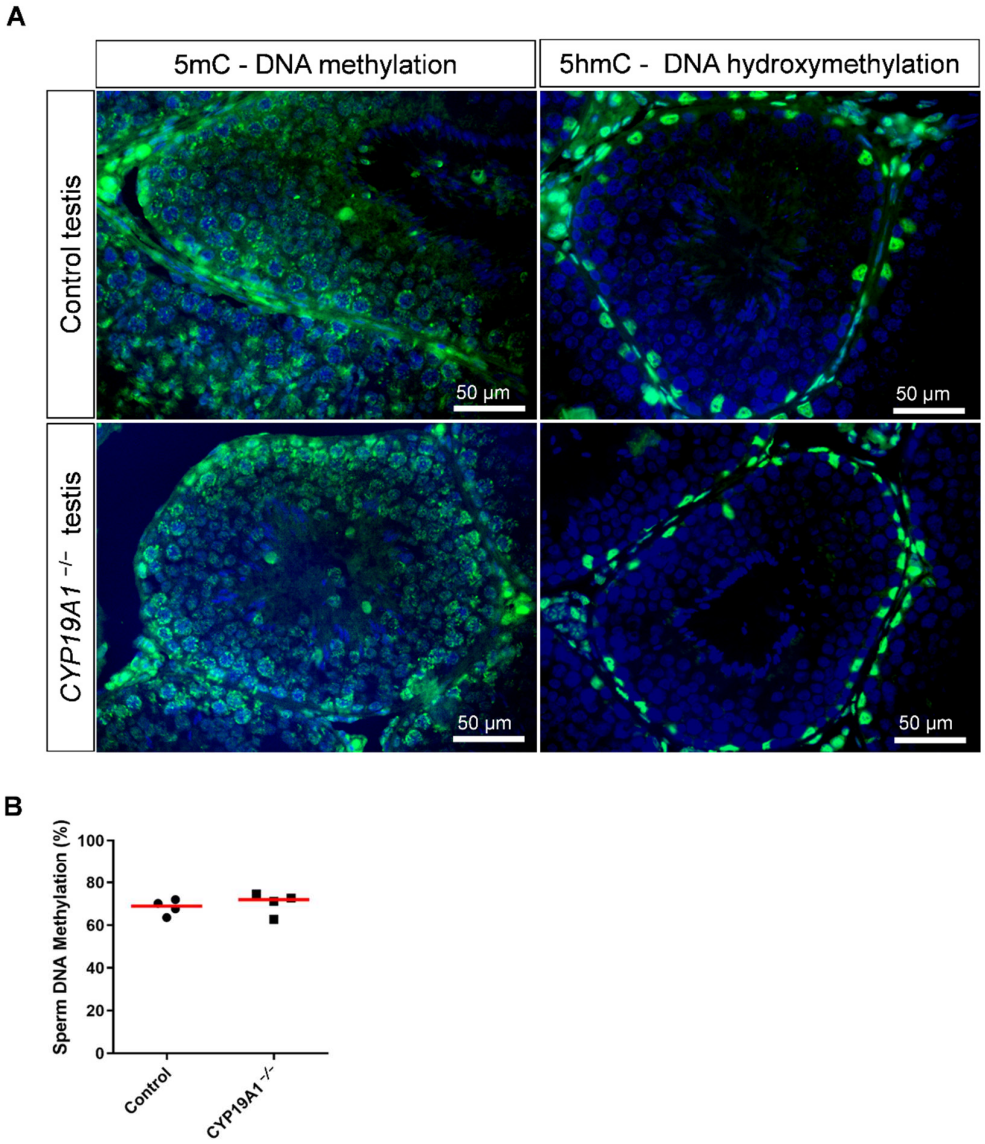


Figure 6. DNA methylation in the testis and sperm in absence of estrogen synthesis. (**A**) Immunodetection of 5mC and 5hmC in control and *CYP19A1*$^{-/-}$ testis (green). Nuclei were stained in blue (DAPI). (**B**) Percentage of sperm DNA methylation from control and *CYP19A1*$^{-/-}$ male rabbits determined by Luminometric Methylation Assay (LUMA). The median is shown in red. Mann–Whitney test: nonsignificant.

3.6. Absence of Testicular Estrogen Leads to Sperm Defects

In order to better understand the subfertility of *CYP19A1*$^{-/-}$ males, the sperm parameters of mutant and control rabbits were evaluated using the IVOS II CASA system on ejaculated sperm. Of the parameters assessed by this procedure, six were found statistically divergent between control and mutant sperm (Figure 7A–F). First, we noticed a decrease in total (from 90% to 55%) and progressive (from 60% to 30%) sperm motility in mutant rabbits (Figure 7A,B). Second, the mutants displayed increased sperm malformations such as bent tails and Distal Midpiece Reflex curvatures (DMR) (Figure 7C,D). Finally, the spermatozoa from mutant animals retained more proximal and distal (Figure 7E,F) cytoplasmic droplets than the control sperm, suggesting an imperfect maturation of the gametes during their transit in the epididymis [42].

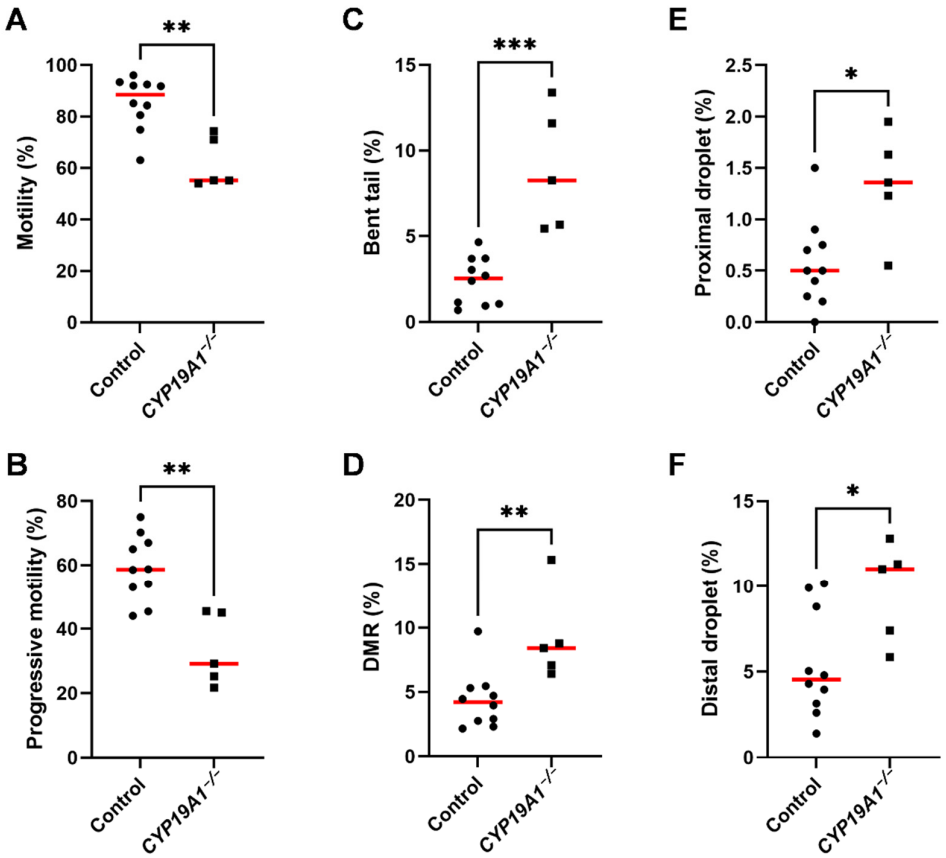


Figure 7. Spermatic parameters in control and *CYP19A1*$^{-/-}$ rabbits. Motility and morphometric parameters of the sperm from control and *CYP19A1*$^{-/-}$ rabbits were obtained by Computer Assisted Sperm Analysis. Percentages of (**A**) total motility and (**B**) progressive motility of the sperm were decreased in mutants. Percentages of (**C**) bent tails and (**D**) Distal Midpiece Reflex were increased in *CYP19A1*$^{-/-}$ semen, together with (**E**) proximal droplets and (**F**) distal droplets. Dots represent the average of two successive semen collections per animal. For *CYP19A1*$^{-/-}$ rabbits, three sets of two successive ejaculations were collected over a one-year interval. The median is shown in red. Control n = 10; *CYP19A1* $^{-/-}$ n = 5. Mann–Whitney test: * *p*-Value < 0.05; ** *p*-Value < 0.005; *** *p*-Value < 0.0005.

4. Discussion

In rabbits, the production of estrogen by the adult testes is strictly limited to the germ cells inside the seminiferous tubules: mainly to the meiotic germ cells (pachytene spermatocytes). While the location of aromatase expression differs according to the published studies, several of them are concordant on this point in rodents and in humans [9,14,15]. Thus, because of the blood-testis barrier established in the tubules, testicular estrogens should not pass through the general circulation in rabbits, but rather have a local function on the germ cells themselves, or on the male genital tract. Accordingly, 17β-Estradiol could be measured in the head and the tail of epididymis, showing that testicular estrogens diffuse into the fluid during the epididymal transit.

4.1. Testicular Estrogens Are Involved in Germ Cells Differentiation

In the testis, both *ESR1* and *ESR2* receptor mRNAs were detected in round spermatids, suggesting that estrogens may have a role on post-meiotic germ cells. Accordingly, hypospermatogenesis has been observed in homozygous *CYP19A1*$^{-/-}$ mutant males, with some testicular lobules showing thinner seminiferous epithelium, with a lack of round spermatids, as described in the ArKO mouse model [31,32]. In the rat, overstimulation of ESR1 or ESR2 leads to spermiogenesis defects [22]. Thus, a lack or an excess of estrogens

may impact spermatid differentiation. Additionally, epigenetic defects in the spermatids have been reported when estrogen receptors were overstimulated [23,24]. Nevertheless, in this present study, we could not detect any changes in DNA methylation in the absence of estrogen. This may be related to the use of inappropriate methods, but estrogen might also not be involved in epigenetic reprograming in normal situations.

In humans, loss-of-function mutations affecting *CYP19A1/Aromatase* gene are very rare and poorly documented. In one reported case, the authors described abnormal skeletal growth and bone maturation in a male patient, which were associated with testicular hypoplasia and infertility [35]. The initiation of a replacement therapy by daily injection of estrogens restored the bone/skeletal phenotype, but had no effect on the testicles or fertility disorders. This last aspect could be linked to the fact that estrogens must be produced locally in the seminiferous tubules in order to be able to act on the differentiation of germ cells. In addition, a testicular biopsy, performed in this patient, revealed hypospermatogenesis and an arrest of germ differentiation, mainly at the level of primary spermatocytes [35]. This phenotype is close to that observed in rabbits, where round spermatids were rare in some tubules of the *CYP19A1*$^{-/-}$ males, suggesting either that estrogens are necessary for their differentiation or maintenance, or that estrogens may be involved in the completion of meiosis. Interestingly, overexposure to estrogen or BPA has the same impact on spermatogenesis, with meiotic progression being defective and stopping at the pachytene stage [43]. In the present study, in rabbits deficient for aromatase, *PRM1* mRNAs levels were found to be decreased which could reflect spermiation disorder or could be an additional clue to consider the function of estrogens on meiotic process. Further investigations involving high throughput transcriptome sequencing may highlight the potential implication of estrogens into meiosis in males.

4.2. Testicular Estrogens Are Involved in Sperm Production, Maturation and Motility

As a consequence of the described defect in spermatogenesis, mild but significant testicular hypoplasia was observed in *CYP19A1*$^{-/-}$ rabbits and the number of ejaculated spermatozoa decreased. These animals presented slight subfertility with conception difficulties (mating without birth), as well as a decrease in the number of offspring. In addition of a decrease in sperm count, an increase in sperm abnormalities was observed. First, like in humans [34,35] and mice [29,31,32], sperm motility was affected, with a 50% reduction in the progressive motility in *CYP19A1*$^{-/-}$ compared to control males. Then, related to the motility defects, increased percentages of flagellar abnormalities were noted, including bent tail and Distal Midpiece Reflex (DMR) which were doubled in mutants. In addition, proportion of sperm with cytoplasmic residual droplets was increased. These last phenotypes could be related to sperm maturation trouble in the epididymis, where sperm motility is acquired. In particular, the cytoplasmic droplet is expected to migrate caudally along the sperm during epididymal transit, and this droplet has been implicated in affecting some biochemical aspects of motility [44]. Some signaling pathways have been associated with sperm motility, and evidence suggests that sperm may have functional flagellar machinery that is activated during epididymal transit [44]. Indeed, in the epididymis, sperm undergo protein changes. As sperm are translationally silent, proteins appearing in them are thought to be synthesized by the epididymal epithelium and then incorporated to the sperm cells, thanks to exosomes for instance, called epididymosomes [45]. *ESR1* and *ESR2* receptor mRNAs were both detected in the epididymis of male rabbits, mainly in the tail, where estrogens seem thus to exert their functions. In particular, *ESR2* transcripts were found in the epithelial cells, which are supposed to secrete epididymosomes. Additional analyses on the transcriptomes and proteomes of mutant epididymides could provide clues to better understand how estrogen pathway dysfunctions impact sperm maturation and motility.

5. Conclusions

In the rabbit, testicular estrogens are produced inside the seminiferous tubules, mainly by meiotic germ cells. They play two main roles in promoting the fertility of the male ga-

mete: (i) on germ cells and their progression in spermatogenesis; (ii) on the epididymis and indirectly on sperm maturation and motility acquisition. The phenotype of the *CYP19A1*$^{-/-}$ rabbits is very similar to the rare cases of *aromatase* mutations reported in humans, making the rabbit a relevant biomedical model for understanding and preventing male fertility.

Author Contributions: Conceptualization, G.J. and M.P.; Methodology, A.D., E.D., M.A., A.A., F.G., H.J., E.S., G.J. and M.P.; Validation, A.D., E.D., A.A., M.A. and H.J.; Formal Analysis, A.D., E.D., E.P. and M.P. Investigation, A.D., G.J. and M.P.; Writing—Original Draft Preparation, M.P., E.P. and A.D.; Writing—Review and Editing, G.J., E.P. and M.P.; Supervision, M.P.; Funding Acquisition, G.J. and E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by ANR (Agence Nationale de la Recherche) grants (GENIDOV: ANR-09-GENM-009; ARGONADS: ANR-13-BSV2-0017; ARDIGERM: ANR-2020-CE14-0022), and CELPHEDIA infrastructure (CELPHEDIA France, 2017).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of Declaration of Helsinki, and approved by the French Ministry MENESR (accreditation number APAFIS#6775-2016091911407980 vI) following the recommendation given by the local committee for ethic in animal experimentation (COMETHEA, Jouy-en-Josas, France). All researchers working directly with the animals possessed an animal experimentation license delivered by the French veterinary services.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Patrice Congar, Gwendoline Morin and all the staff of the facility (SAAJ, INRAE, Jouy-en-Josas, France) for the care of the rabbits and semen collection, and Julie Rivière and Marthe Vilotte (UMR GABI, INRAE, Jouy-en-Josas, France) for their assistance on the histological platform (@Bridge platform) and for the access to the virtual slide scanner.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Guiguen, Y.; Baroiller, J.F.; Ricordel, M.J.; Iseki, K.; Mcmeel, O.M.; Martin, S.A.; Fostier, A. Involvement of Estrogens in the Process of Sex Differentiation in Two Fish Species: The Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and a Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* **1999**, *54*, 154–162. [CrossRef]
2. Pieau, C.; Dorizzi, M.; Richard-Mercier, N. Temperature-Dependent Sex Determination and Gonadal Differentiation in Reptiles. *Cell Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 887–900. [CrossRef]
3. Elbrecht, A.; Smith, R.G. Aromatase Enzyme Activity and Sex Determination in Chickens. *Science* **1992**, *255*, 467–470. [CrossRef] [PubMed]
4. Wade, J.; Arnold, A.P. Functional Testicular Tissue Does Not Masculinize Development of the Zebra Finch Song System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5264–5268. [CrossRef] [PubMed]
5. Vaillant, S.; Dorizzi, M.; Pieau, C.; Richard-Mercier, N. Sex Reversal and Aromatase in Chicken. *J. Exp. Zool.* **2001**, *290*, 727–740. [CrossRef] [PubMed]
6. Jost, A. A New Look at the Mechanisms Controlling Sex Differentiation in Mammals. *Johns Hopkins Med. J.* **1972**, *130*, 38–53.
7. Hess, R.A.; Sharpe, R.M.; Hinton, B.T. Estrogens and Development of the Rete Testis, Efferent Ductules, Epididymis and Vas Deferens. *Differentiation* **2021**, *118*, 41–71. [CrossRef]
8. Lambard, S.; Silandre, D.; Delalande, C.; Denis-Galeraud, I.; Bourguiba, S.; Carreau, S. Aromatase in Testis: Expression and Role in Male Reproduction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *95*, 63–69. [CrossRef]
9. Levallet, J.; Bilinska, B.; Mittre, H.; Genissel, C.; Fresnel, J.; Carreau, S. Expression and Immunolocalization of Functional Cytochrome P450 Aromatase in Mature Rat Testicular Cells1. *Biol. Reprod.* **1998**, *58*, 919–926. [CrossRef]
10. Fraczek, B.; Kotula-Balak, M.; Wojtusiak, A.; Pierściński, A.; Bilińska, B. Cytochrome P450 Aromatase in the Testis of Immature and Mature Pigs. *Reprod. Biol.* **2001**, *1*, 51–59.
11. Sipahutar, H.; Sourdaine, P.; Moslemi, S.; Plainfossé, B.; Séralini, G.-E. Immunolocalization of Aromatase in Stallion Leydig Cells and Seminiferous Tubules. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 311–318. [CrossRef] [PubMed]
12. Payne, A.H.; Kelch, R.P.; Musich, S.S.; Halpern, M.E. Intratesticular Site of Aromatization in the Human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1976**, *42*, 1081–1087. [CrossRef]

13. Papadopoulos, V.; Carreau, S.; Szerman-Joly, E.; Drosdowsky, M.A.; Dehennin, L.; Scholler, R. Rat Testis 17β-Estradiol: Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Age Related Cellular Distribution. *J. Steroid Biochem.* **1986**, *24*, 1211–1216. [CrossRef]
14. Nitta, H.; Bunick, D.; Hess, R.A.; Janulis, L.; Newton, S.C.; Millette, C.F.; Osawa, Y.; Shizuta, Y.; Toda, K.; Bahr, J.M. Germ Cells of the Mouse Testis Express P450 Aromatase. *Endocrinology* **1993**, *132*, 1396–1401. [CrossRef]
15. Lambard, S.; Galeraud-Denis, I.; Saunders, P.T.K.; Carreau, S. Human Immature Germ Cells and Ejaculated Spermatozoa Contain Aromatase and Oestrogen Receptors. *J. Mol. Endocrinol.* **2004**, *32*, 279–289. [CrossRef]
16. Rago, V.; Aquila, S.; Panza, R.; Carpino, A. Cytochrome P450arom, Androgen and Estrogen Receptors in Pig Sperm. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2007**, *5*, 23. [CrossRef]
17. Dostalova, P.; Zatecka, E.; Dvorakova-Hortova, K. Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, E904. [CrossRef]
18. Pelletier, G.; El-Alfy, M. Immunocytochemical Localization of Estrogen Receptors Alpha and Beta in the Human Reproductive Organs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 4835–4840. [CrossRef]
19. Fietz, D.; Ratzenböck, C.; Hartmann, K.; Raabe, O.; Kliesch, S.; Weidner, W.; Klug, J.; Bergmann, M. Expression Pattern of Estrogen Receptors α and β and G-Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 in the Human Testis. *Histochem. Cell Biol.* **2014**, *142*, 421–432. [CrossRef]
20. Cavaco, J.E.B.; Laurentino, S.S.; Barros, A.; Sousa, M.; Socorro, S. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Human Testis: Both Isoforms Are Expressed. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2009**, *55*, 137–144. [CrossRef]
21. Hirata, S.; Shoda, T.; Kato, J.; Hoshi, K. Isoform/Variant MRNAs for Sex Steroid Hormone Receptors in Humans. *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, *14*, 124–129. [CrossRef]
22. Dumasia, K.; Kumar, A.; Deshpande, S.; Sonawane, S.; Balasinor, N.H. Differential Roles of Estrogen Receptors, ESR1 and ESR2, in Adult Rat Spermatogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* **2016**, *428*, 89–100. [CrossRef] [PubMed]
23. Dumasia, K.; Kumar, A.; Deshpande, S.; Balasinor, N.H. Estrogen, through Estrogen Receptor 1, Regulates Histone Modifications and Chromatin Remodeling during Spermatogenesis in Adult Rats. *Epigenetics* **2017**, *12*, 953–963. [CrossRef] [PubMed]
24. Dumasia, K.; Kumar, A.; Deshpande, S.; Balasinor, N.H. Estrogen Signaling, through Estrogen Receptor β, Regulates DNA Methylation and Its Machinery in Male Germ Line in Adult Rats. *Epigenetics* **2017**, *12*, 476–483. [CrossRef] [PubMed]
25. Krege, J.H.; Hodgin, J.B.; Couse, J.F.; Enmark, E.; Warner, M.; Mahler, J.F.; Sar, M.; Korach, K.S.; Gustafsson, J.A.; Smithies, O. Generation and Reproductive Phenotypes of Mice Lacking Estrogen Receptor Beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 15677–15682. [CrossRef] [PubMed]
26. Antal, M.C.; Krust, A.; Chambon, P.; Mark, M. Sterility and Absence of Histopathological Defects in Nonreproductive Organs of a Mouse ERbeta-Null Mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2433–2438. [CrossRef]
27. Otto, C.; Fuchs, I.; Kauselmann, G.; Kern, H.; Zevnik, B.; Andreasen, P.; Schwarz, G.; Altmann, H.; Klewer, M.; Schoor, M.; et al. GPR30 Does Not Mediate Estrogenic Responses in Reproductive Organs in Mice. *Biol. Reprod.* **2009**, *80*, 34–41. [CrossRef]
28. Eddy, E.M.; Washburn, T.F.; Bunch, D.O.; Goulding, E.H.; Gladen, B.C.; Lubahn, D.B.; Korach, K.S. Targeted Disruption of the Estrogen Receptor Gene in Male Mice Causes Alteration of Spermatogenesis and Infertility. *Endocrinology* **1996**, *137*, 4796–4805. [CrossRef]
29. Joseph, A.; Hess, R.A.; Schaeffer, D.J.; Ko, C.; Hudgin-Spivey, S.; Chambon, P.; Shur, B.D. Absence of Estrogen Receptor Alpha Leads to Physiological Alterations in the Mouse Epididymis and Consequent Defects in Sperm Function. *Biol. Reprod.* **2010**, *82*, 948–957. [CrossRef]
30. Joseph, A.; Shur, B.D.; Ko, C.; Chambon, P.; Hess, R.A. Epididymal Hypo-Osmolality Induces Abnormal Sperm Morphology and Function in the Estrogen Receptor Alpha Knockout Mouse. *Biol. Reprod.* **2010**, *82*, 958–967. [CrossRef]
31. Robertson, K.M.; O'Donnell, L.; Jones, M.E.E.; Meachem, S.J.; Boon, W.C.; Fisher, C.R.; Graves, K.H.; McLachlan, R.I.; Simpson, E.R. Impairment of Spermatogenesis in Mice Lacking a Functional Aromatase (Cyp 19) Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7986–7991. [CrossRef]
32. Robertson, K.M.; Simpson, E.R.; Lacham-Kaplan, O.; Jones, M.E.E. Characterization of the Fertility of Male Aromatase Knockout Mice. *J. Androl.* **2001**, *22*, 825–830. [CrossRef]
33. Haverfield, J.T.; Ham, S.; Brown, K.A.; Simpson, E.R.; Meachem, S.J. Teasing out the Role of Aromatase in the Healthy and Diseased Testis. *Spermatogenesis* **2011**, *1*, 240. [CrossRef]
34. Herrmann, B.L.; Saller, B.; Janssen, O.E.; Gocke, P.; Bockisch, A.; Sperling, H.; Mann, K.; Broecker, M. Impact of Estrogen Replacement Therapy in a Male with Congenital Aromatase Deficiency Caused by a Novel Mutation in the CYP19 Gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 5476–5484. [CrossRef]
35. Carani, C.; Qin, K.; Simoni, M.; Faustini-Fustini, M.; Serpente, S.; Boyd, J.; Korach, K.S.; Simpson, E.R. Effect of Testosterone and Estradiol in a Man with Aromatase Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **1997**, *337*, 91–95. [CrossRef]
36. Jolivet, G.; Daniel-Carlier, N.; Harscoët, E.; Airaud, E.; Dewaele, A.; Pierson, C.; Giton, F.; Boulanger, L.; Daniel, N.; Mandon-Pépin, B.; et al. Fetal Estrogens Are Not Involved in Sex Determination But Critical for Early Ovarian Differentiation in Rabbits. *Endocrinology* **2022**, *163*, bqab210. [CrossRef]
37. Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. QBase Relative Quantification Framework and Software for Management and Automated Analysis of Real-Time Quantitative PCR Data. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R19. [CrossRef]

38. Giton, F.; Sirab, N.; Franck, G.; Gervais, M.; Schmidlin, F.; Ali, T.; Allory, Y.; de la Taille, A.; Vacherot, F.; Loric, S.; et al. Evidence of Estrone-Sulfate Uptake Modification in Young and Middle-Aged Rat Prostate. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *152*, 89–100. [CrossRef]
39. Devillers, M.M.; Petit, F.; Cluzet, V.; François, C.M.; Giton, F.; Garrel, G.; Cohen-Tannoudji, J.; Guigon, C.J. FSH Inhibits AMH to Support Ovarian Estradiol Synthesis in Infantile Mice. *J. Endocrinol.* **2019**, *240*, 215–228. [CrossRef]
40. Perrier, J.-P.; Sellem, E.; Prézelin, A.; Gasselin, M.; Jouneau, L.; Piumi, F.; Al Adhami, H.; Weber, M.; Fritz, S.; Boichard, D.; et al. A Multi-Scale Analysis of Bull Sperm Methylome Revealed Both Species Peculiarities and Conserved Tissue-Specific Features. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 404. [CrossRef]
41. Karimi, M.; Johansson, S.; Stach, D.; Corcoran, M.; Grandér, D.; Schalling, M.; Bakalkin, G.; Lyko, F.; Larsson, C.; Ekström, T.J. LUMA (LUminometric Methylation Assay)—A High Throughput Method to the Analysis of Genomic DNA Methylation. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 1989–1995. [CrossRef] [PubMed]
42. Cooper, T.G. Cytoplasmic Droplets: The Good, the Bad or Just Confusing? *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 9–11. [CrossRef] [PubMed]
43. Liu, C.; Duan, W.; Li, R.; Xu, S.; Zhang, L.; Chen, C.; He, M.; Lu, Y.; Wu, H.; Pi, H.; et al. Exposure to Bisphenol A Disrupts Meiotic Progression during Spermatogenesis in Adult Rats through Estrogen-like Activity. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e676. [CrossRef] [PubMed]
44. Gervasi, M.G.; Visconti, P.E. Molecular Changes and Signaling Events Occurring in Sperm during Epididymal Maturation. *Andrology* **2017**, *5*, 204–218. [CrossRef]
45. Sullivan, R.; Saez, F. Epididymosomes, Prostasomes, and Liposomes: Their Roles in Mammalian Male Reproductive Physiology. *Reproduction* **2013**, *146*, R21–R35. [CrossRef]

Annexe 2

Génétique de la différenciation gonadique, une étape clé du déterminisme du sexe et de la fertilité à l'âge adulte

Emilie Dujardin, Eric Pailhoux

Médecine de la Reproduction 2022;24(2):194-201

Génétique de la différenciation gonadique, une étape clé du déterminisme du sexe et de la fertilité à l'âge adulte

Genetics of gonadal differentiation, a key step in the determination of adult sex and fertility

Émilie Dujardin,
Éric Pailhoux

Université Paris-Saclay, Inrae, ENVA, UVSQ, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France
<eric.pailhoux@inrae.fr>

Résumé : les connaissances des processus de détermination du sexe et de différenciation des gonades ont énormément progressé ces trois dernières décennies suite à la découverte du gène *Sry*, déterminant testiculaire chez les mammifères. Les travaux de génétique humaine, le séquençage à haut débit et les études de génomique fonctionnelle ont permis d'avoir une vision claire des interactions cellulaires et des cascades génétiques impliquées dans la différenciation des gonades des deux sexes. Cette brève revue fait l'état des lieux des connaissances actuelles de la différenciation gonadique chez les mammifères, replacées dans le contexte plus général de la mise en place des caractères sexuels chez les vertébrés.

Mots clés : déterminisme du sexe, différenciation des gonades, testicules, ovaires, mammifères, vertébrés

Abstract: *The knowledge of sex determination and gonads differentiation processes have made significant progress these three last decades since the SRY gene discovery, the testis determining factor in mammals. Human genetics, high throughput sequencing, and functional genomic studies allowed us to have a clear vision of both sexes' cellular interactions and genetic pathways involved in gonad differentiation. This short review takes stock of the current knowledge of gonadal differentiation in mammals replaced in a more general context of sexual characteristics development in vertebrates.*

Key words: *sex determination, gonads differentiation, testis, ovaries, mammals, vertebrates*

La détermination du sexe, dont l'étape clé de la différenciation des gonades dans les deux sexes, a fait l'objet de nombreuses découvertes depuis une trentaine d'années. Les progrès de nos connaissances dans ce domaine concernent toutes les espèces de vertébrés dont les mammifères et l'homme. Chez les mammifères, une étape primordiale atteinte en 1990, est la découverte du gène « déterminant du sexe », le gène situé au sommet de la cascade génétique activée pour induire la différenciation de la gonade en testicule, le TDF (pour *testis determining factor*). Ce gène, nommé *Sry*/*Sry* (pour *sex-determining region of Y chromosome*) répond à tous les critères du déterminant testiculaire :

- il est porté par le chromosome Y,
- il est fortement exprimé dans les gonades XY indifférenciées au moment où elles vont entamer leur différenciation en testicules,
- sa perte de fonction chez les individus XY entraîne une absence de différenciation testiculaire et une inversion du sexe de type femme/femelle XY,
- sa présence chez les individus XX conduit au développement de testicules en lieu et place des ovaires et à des phénotypes d'inversion du sexe de type homme/mâle XX [1].

Depuis cette découverte pionnière, de nombreux progrès ont été réalisés dans la caractérisation de multiples acteurs des cascades génétiques impliquées dans la différenciation des crêtes génitales indifférenciées, de la différenciation testiculaire en aval de *Sry*/*Sry* et de la différenciation ovarienne.

Médecine de la Reproduction

Tirés à part : É. Pailhoux

doi : 10.1684/mte.2019.0883

En plus de ces aspects génétiques, de nombreuses connaissances ont été acquises au niveau de la différenciation des différents types cellulaires constituant les gonades et des interactions cellulaires nécessaires à la mise en place de gonades fonctionnelles capables d'assurer leur rôle principal exocrine de production des gamètes mâles et femelles à l'âge adulte [2]. Tous ces acquis sont étroitement liés aux évolutions technologiques telles que le séquençage à haut débit, notamment le séquençage de l'exome chez l'homme, les catalogues exhaustifs des gènes exprimés (transcriptomes) tant au niveau tissulaire que plus récemment à l'échelle de la cellule isolée, les technologies de modifications ciblées des génomes (*genome editing*) et le recours à différents modèles animaux. Cet article abordera quelques-unes des avancées majeures du domaine ; nos excuses aux nombreux auteurs dont les travaux ne pourront être mentionnés ici.

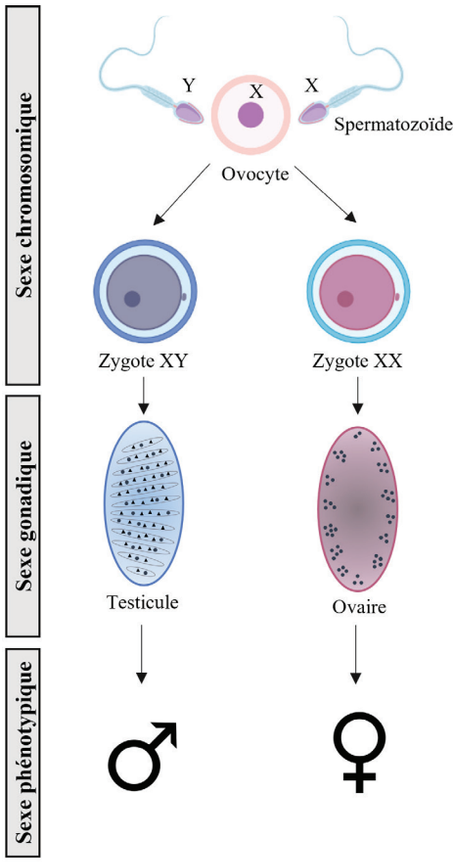
Les grandes étapes du développement sexuel chez les vertébrés

Chez les espèces sexuées dont le déterminisme du sexe est génétique (GSD, pour *genetic sex determination*), le sexe de l'individu est prédéterminé au moment de la fécondation, au stade embryonnaire unicellulaire (zygote, cellule œuf), puisqu'à ce stade l'embryon possède déjà un « sexe chromosomique » distinct entre les futurs mâles (XY ou ZZ) et les futures femelles (XX ou ZW). Le sexe chromosomique dépend entièrement du chromosome sexuel apporté par le gamète du parent hétérogamétique : le père et son spermatozoïde fécondant (X ou Y) dans un système XX/XY (mammifères) ; la femelle et son ovule fécondée (Z ou W) dans un système ZZ/ZW (oiseaux). Le déterminisme génétique permet donc théoriquement l'obtention d'un sex-ratio équilibré à 50/50 et la conservation de l'espèce (d'un point de vu reproductif), contrairement aux espèces dont le sexe dépend de l'environnement (ESD, pour *environmental sex determination*) qui pourraient produire une descendance mono-sexe en cas de changements environnementaux exceptionnels.

Le sexe chromosomique est primordial pour la différenciation sexuelle du futur individu car les chromosomes sexuels portent le ou les gènes déterminants du devenir de la gonade ; en testicule si l'individu est XY ou en ovaire si l'individu est XX. Autrement dit, le sexe chromosomique contrôle génétiquement le sexe gonadique qui lui-même va contrôler, via la fonction endocrine des gonades et la production des stéroïdes sexuelles, un grand nombre de caractères sexuellement di-morphiques à l'âge adulte (*figure 1*). De grandes avancées ont été réalisées ces dernières décennies dans la compréhension de ce contrôle génétique de la différenciation gonadique au travers des espèces vertébrées. Parmi les avancées majeures il faut en retenir deux :

– les gènes déterminants du devenir gonadique, portés par les chromosomes sexuels, sont très variables entre les espèces (l'évo-

Figure 1.



Les grandes étapes du développement sexuel. Chez les mammifères, le développement sexuel se réalise en trois grandes étapes successives qui correspondent à l'établissement du sexe chromosomique, puis du sexe gonadique et enfin du sexe phénotypique. Le sexe chromosomique déterminé à la fécondation, contrôle génétiquement le sexe gonadique puisque les chromosomes sexuels portent les gènes déterminants du devenir de la gonade vers la voie testiculaire ou ovarienne. Le sexe phénotypique est ensuite fortement influencé par la production hormonale des gonades (Hormone Anti-Müllérienne, AMH et stéroïdes sexuels, androgènes et œstrogènes).

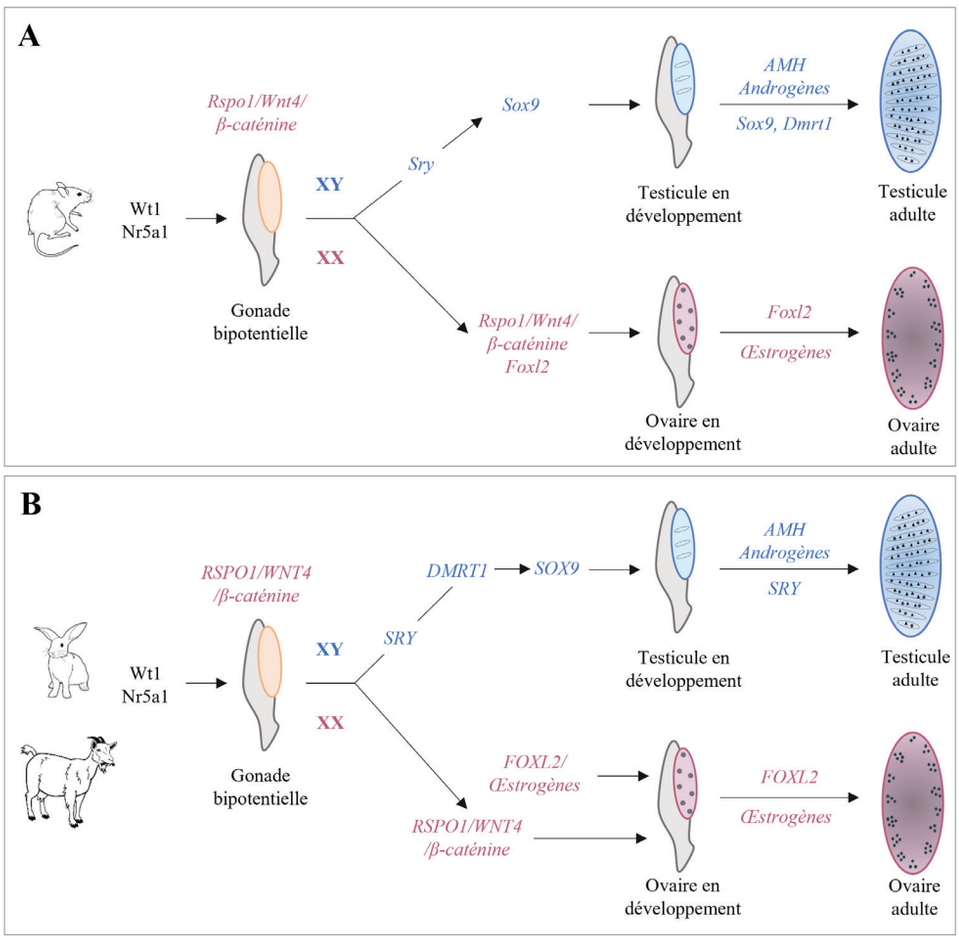
lution se fait du bas vers le haut de la cascade génétique) [3],

– sur plusieurs dizaines de gènes actuellement découverts dans différentes espèces, la majorité est représentée par des déterminants testiculaires qui vont d'une part, activer les gènes de la cascade testiculaire/mâle et d'autre part, inhiber ceux de la cascade ovarienne/femelle.

L'évolution du bas vers le haut de la cascade génétique est également illustrée par la très faible conservation du déterminant testiculaire des mammifères, le gène *Sry*/*Sry*. Non seulement *Sry*/*Sry* n'est présent que chez les mammifères euthériens (marsupiaux et placentaires) ; son degré de conservation entre les différentes espèces de mammifères est extrêmement faible (74% d'identité protéique au niveau du domaine de liaison à l'ADN entre la souris et l'homme ; moins de 30% dans les autres parties protéiques) ; et plusieurs espèces de rongeurs ont déjà « perdu » le gène *Sry* pour évoluer vers d'autres déterminants qui restent à découvrir [4].

Figure 2.

Les principaux acteurs de la différenciation gonadique chez les mammifères rongeurs (A) ou non rongeurs (B). Schéma des gènes majeurs impliqués dans la différenciation des crêtes génitales (à gauche), puis dans la différenciation testiculaire et ovarienne (au milieu), et enfin dans la mise en place du tractus génital dans les deux sexes et du maintien de l'identité des cellules somatiques des gonades (à droite). Les différences principales entre les mammifères rongeurs (A) et non rongeurs (B) portent sur le rôle des gènes DMRT1 (voie testiculaire) et FOXL2 (voie ovarienne) qui ont conservé une fonction déterminante dès l'initiation de la différenciation gonadique chez les mammifères non rongeurs. De plus, le maintien de l'identité de la cellule de Sertoli à l'âge adulte pourrait être assuré directement par le gène *Sry* chez les mammifères non rongeurs.



La différenciation gonadique

Généralités

La gonade se forme à partir d'un organe intermédiaire appelé le mésonephros. Cet organe est considéré comme un « rein » transitoire. Il va dégénérer au cours de l'embryogenèse et il est à l'origine des gonades et des canaux de Wolff et Müller, eux-mêmes précurseurs respectivement, du tractus génital interne mâle et femelle. La gonade primitive ou crête génitale se forme suite à un épaississement de l'épithélium cœlomique et du mésenchyme sous-jacent de la face interne du mésonephros, résultant d'une prolifération cellulaire intense localisée à cet endroit. Durant cette phase de formation des crêtes génitales, les cellules germinales vont migrer depuis les tissus extra-embryonnaires où elles se sont différenciées pour coloniser les futures gonades. Après que les cellules germinales aient colonisé les crêtes génitales ou gonades indifférenciées bi-potentielles, ces dernières vont débuter leur différenciation sous l'influence du sexe chromosomique. Plusieurs centaines de gènes sont impliqués dans ces étapes dites de « détermination du sexe », d'une part des gènes clés de la formation des crêtes génitales dans les deux sexes, et d'autre part les gènes de la cascade génétique testiculaire/mâle en aval de *SRY* chez les individus XY ou les gènes de la cascade génétique ovarienne/femelle chez les fœtus XX.

Il est impossible de lister l'ensemble des milliers de gènes impliqués dans la formation des gonades des deux sexes, ainsi, la suite de ce paragraphe va décrire les principales étapes de ce processus et les connaissances majeures acquises ces dernières années tant au niveau cellulaire qu'aux niveaux génétique et moléculaire.

Formation des crêtes génitales

Les crêtes génitales se différencient sur la face interne du mésonephros suite à une prolifération cellulaire intense, notamment au niveau de l'épithélium cœlomique. Cette prolifération est visible dans les deux sexes mais elle est plus intense dans les gonades XY que dans les gonades XX. Cette prolifération sexuellement di-morphique est très importante à plus d'un titre :

- elle est la source principale des futures cellules de soutien des gonades (Sertoli pour le testicule, pré-granulosa pour l'ovaire),
- elle est en soit déterminante du devenir gonadique car si son intensité « faiblie » dans la gonade XY, la différenciation testiculaire devient compromise,
- elle conduit au fait qu'un testicule contient plus de cellules et est plus volumineux qu'une gonade XX dès les premiers stades de différenciation gonadique.

Plusieurs gènes et voies de signalisation sont impliquées dans cette prolifération. Nous ne citerons ici que deux exemples : la voie *Igf1/Insuline* et la voie *Rspo1/Wnt4/b-caténine*. La triple ablation des gènes codants les récepteurs à l'insuline (*Ir*), à l'IGF1 (*Igf1r*) et à un récepteur apparenté à l'insuline (*Irr*) induit une diminution drastique de la prolifération et une différenciation ovarienne retardée des gonades des fœtus murins mutants XY et XX [5,6]. Par ailleurs, la double ablation des gènes codants pour R-Spondin 1 (*Rspo1*) et WNT4 (*Wnt4*), deux protéines sécrétées impliquées dans l'activation de la voie b-caténine canonique, induit également une diminution de la prolifération précoce de l'épithélium cœlomique et conduit à la formation de testicules hypoplasiques chez les souris mutantes [7].

Plusieurs gènes majeurs sont également impliqués dans la différenciation des crêtes génitales. Nous retiendrons ici deux gènes codants pour des facteurs de transcription dont le rôle est majeur pour la formation du système uro-génital, *WT1* (*Wilm's tumor gene 1*) et la formation du système gonado-surrénalien, *SF1/NR5A1* (*steroidogenic factor 1/nuclear receptor family 5, group A, gene 1*). L'ablation de l'un ou l'autre de ces deux gènes (*Wt1* ou *Sf1*) chez la souris, conduit, entre autres, à un arrêt précoce de la formation des crêtes génitales et une agénésie gonadique chez les souris mutantes [8-11]. Ces deux gènes sont exprimés dans les gonades des deux sexes et à tous les stades de leur différenciation. De ce fait, leurs rôles et leurs cibles moléculaires varient en fonction du type cellulaire gonadique étudié et de son stade de développement considéré. Il en résulte que différentes mutations du gène *SF1/NR5A1*, produisant différents variant protéiques, sont à l'origine de nombreux phénotypes différents de la différenciation sexuelle chez l'homme [12,13].

Formation du testicule

Chez les mammifères euthériens, l'engagement de la différenciation de la gonade en testicule est déterminé par l'expression du déterminant testiculaire, le gène *Sry/Sry* porté par le chromosome Y (*figure 2*). Les nombreux travaux réalisés depuis la découverte du gène *Sry* en 1990 [14] ont permis de mieux comprendre la régulation de ce facteur clé, sa fonction et ses cibles moléculaires. Le rôle primordial de *Sry* se joue dans les cellules précurseurs

des cellules de soutien, aussi appelées « pré-Sertoli » où il va activer sa cible majeure, le gène *SOX9*/*Sox9* (pour *Sry-related HMG-box, gene 9*) [15-18], facteur clé de la différenciation de la cellule de Sertoli. Une fois différenciée, la cellule de Sertoli va orchestrer l'ensemble des processus de la différenciation testiculaire dont pour exemple, la vascularisation gonadique de type mâle, la formation des cordons séminifères, la différenciation des cellules de Leydig, ainsi que l'engagement des cellules germinales dans une destinée de type mâle. Autrement dit, la différenciation testiculaire est entièrement basée sur la lignée somatique dite « de soutien » de la gonade, d'ailleurs, elle peut advenir en absence de la lignée germinale. Par conséquent, le signal moléculaire majeur de la différenciation testiculaire est l'activation du gène *SOX9* (dont l'expression testiculaire est limitée aux cellules de Sertoli) jusqu'à un niveau « masculinisant » (notion de seuil). Chez la souris, cette augmentation de l'expression de *SOX9*/*Sox9*, spécifiquement dans la cellule de Sertoli est directement contrôlée par les niveaux d'expression du gène *Sry*, dont la protéine (*Sry*) agit en étroite collaboration avec le facteur NR5A1/SF1 sur une région régulatrice distale du gène *SOX9*/*Sox9*, nommée *Enhancer 13* [19,20] (*figure 2A*). Chez les mammifères non rongeurs, dont l'espèce humaine, plusieurs évidences démontrent que le facteur DMRT1 (pour *Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor, gene 1*) serait également requis en plus de *Sry* et SF1 pour activer suffisamment le gène *SOX9* et déclencher la différenciation testiculaire [21, 22] (*figure 2B*). Des travaux en cours dans l'équipe sont en passe de démontrer le rôle déterminant de DMRT1 dans la différenciation testiculaire chez le lapin.

Formation de l'ovaire

Une différence majeure de la différenciation ovarienne par rapport à la différenciation testiculaire est un décalage dans le temps de la différenciation des sous-unités fonctionnelles de la gonade : les follicules ovariens qui sont « le pendant femelle » des cordons séminifères testiculaires. En effet, la différenciation des follicules (ou folliculogenèse) ne débute qu'après les étapes

de prolifération des cellules germinales,

de leur entrée en méiose puis leur blocage en fin de prophase I.

De ce fait, la différenciation des cellules de soutien en cellules de la granulosa se fait beaucoup plus tardivement dans l'ovaire comparée à la différenciation des cellules de Sertoli, qui, comme décrit précédemment, constitue l'évènement fondateur de la différenciation testiculaire. Par ailleurs, le dialogue entre cellules germinales et cellules somatiques (pré-granulosa puis granulosa) joue un rôle primordial à toutes les étapes de la différenciation ovarienne. Contrairement au testicule, un ovaire ne peut se différencier en absence de cellules germinales.

Une autre particularité de la différenciation ovarienne est qu'il existe deux chronologies des évènements au sein des mammifères euthériens. Il faut distinguer les espèces dites à méiose immédiate, que sont les rongeurs, des espèces à méiose retardée constituées de toutes les autres. Chez la souris, l'entrée en méiose des cellules germinales se déclenche très rapidement (à 13,5 jours *post-coïtum* [j*pc*]) après les étapes de différenciation gonadique (12,5 j*pc*). La formation des nids ovigères ne débutera qu'une fois que la méiose est bien engagée, vers 15,5 j*pc*. Chez les mammifères non rongeurs, la différenciation ovarienne débute par une étape de prolifération cellulaire intense, œstrogèno-dépendante, qui conduit à la formation des nids ovigères. L'entrée en méiose des cellules germinales ne débute qu'après cette étape de formation des nids ovigères, soit quinze à vingt jours après l'étape de différenciation gonadique *per se*.

Deux voies moléculaires majeures sont impliquées dans la différenciation ovarienne :

- la voie RSPO1/WNT4/b-caténine dite canonique active chez tous les mammifères (*figure 2*) [23-27],
- la voie FOXL2/aromatase/œstrogènes inactive chez les rongeurs aux stades pré-méiotiques (*figure 2B*) [21,28-32].

Comme évoqué précédemment, la voie RSPO1/WNT4/b-caténine est impliquée très précocement dans la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique dans les crêtes génitales des deux sexes [7]. Par la suite, cette voie est inhibée dans le testicule en différenciation, principalement sous l'influence de SOX9, alors que son expression est primordiale et maintenue dans l'ovaire pré-méiotique [25]. Dans l'ovaire en développement, cette voie contrôle :

- l'inhibition d'une vascularisation de type testiculaire,
- l'inhibition de la synthèse d'androgènes,
- la différenciation des cellules de soutien en cellule femelle de pré-granulosa,
- le maintien de l'état pluripotent des cellules germinales femelles, permettant ainsi leur prolifération mitotique nécessaire avant leur entrée en méiose [33].

La voie FOXL2/CYP19A1-aromatase/œstrogènes s'active plus tardivement que la voie b-caténine. Elle n'est activée que dans l'ovaire sans que l'on connaisse actuellement les éléments déclencheurs. Cette voie est primordiale chez les mammifères non-rongeurs où :

- elle empêche la différenciation testiculaire via l'inhibition, par FOXL2, de l'expression de *DMRT1* dans la cellule de soutien [21],
- elle favorise la prolifération cellulaire et la formation des nids ovigères, via la production d'œstrogènes [32].

Cette voie semble inactive dans la différenciation ovarienne pré-méiotique chez les rongeurs bien qu'ils continuent d'exprimer *Foxl2* précocement. Plusieurs travaux démontrent néanmoins, qu'elle se réactive lors de la folliculogenèse et aux stades adultes où elle est nécessaire au maintien de l'identité somatique (granulosa/thèque) de l'ovaire murin [34].

Perspectives de recherche et thérapeutiques

Nos connaissances des processus de détermination du sexe et de différenciation gonadique ont énormément progressé depuis 1990 et la mise en évidence du facteur déterminant du testicule des mammifères, *Sry*. De très nombreux acteurs majeurs ont été découverts grâce à la génétique humaine et l'étude de patients atteints de désordre du développement sexuel (DSD, pour *disorders of sex development*). Ces dernières années, le séquençage de l'exome humain a permis la mise en évidence de nouveaux variants de gènes connus ou inconnus pour leur implication dans la détermination du sexe, responsables de DSD. Le gène DHX37 (pour *DEAH-box helicase 37*) en est une parfaite illustration. Des variants protéiques de ce gène, exprimé dans de nombreux tissus et types cellulaires, sont responsables de défauts drastiques de la différenciation testiculaire [35], alors que d'autres variants du même gène conduisent à des pathologies neurodéveloppementales sans atteinte génitale [36]. De nombreux cas de DSD restent à élucider d'un point de vu génétique et des progrès dans ce domaine devront être faits.

De nombreuses informations capitales ont également été obtenues grâce à l'établissement du transcriptome à partir de cellules isolées. Cette approche permet de décortiquer les différentes étapes de développement des différents types cellulaires constituant les gonades, en établissant l'évolution des profils des nombreux gènes activés séquentiellement à chaque étape. Cette nouvelle approche, en plein essor, va permettre de connaitre de façon exhaustive l'ensemble des centaines, voire milliers de gènes impliqués dans la mise en place du système reproducteur chez de nombreuses espèces dont l'homme. La compréhension précise des cascades génétiques impliquées dans ces processus permettra d'affiner le diagnostic génétique chez de nombreux patients. Plus le diagnostic génétique sera précis et plus la prise en charge du patient sera efficace, non seulement au niveau des caractères de fertilité et de procréation mais également au niveau des traitements hormonaux substitutifs, sans occulter l'aspect préventif de l'apparition de certaines tumeurs spécifiques des gonades.

Enfin, les nombreuses études en cours de l'évolution des marques épigénétiques des lignées somatiques et germinale durant le développement des gonades devraient aussi permettre de mieux comprendre l'impact de l'environnement maternel puis post-natal sur ces processus de différenciation et la fertilité à l'âge adulte. Ces nouvelles connaissances permettront potentiellement de mieux mitiger les impacts environnementaux responsables, à l'heure actuelle, d'une dégradation de différents critères de fertilité dans l'espèce humaine [37, 38].

Remerciements : Les auteurs remercient Patricia Fauque et Florian Guillou pour leur invitation à participer à ce numéro spécial. Les auteurs remercient l'Agence nationale pour la recherche qui, au travers de différents projets financés (ANR-09-GENM-GENIDOV ; ANR-13-BSV2-ARGONADS ; ANR-16-CE14-SexMaintain ; ANR-19-CE14-RNA-Sex ; ANR-20-CE14-ARDIGERM), a permis à l'équipe de développer ses travaux sur la détermination du sexe chez différents mammifères d'élevage.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination and *Sry*: down to a wink and a nudge? *Trends Genet* 2009; 25: 19-29.

2. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 509-21.

3. Pan Q, Kay T, Depincé A, *et al.* Evolution of master sex determiners: TGF-□ signalling pathways at regulatory crossroads. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2021; 376: 20200091.

4. Saunders PA, Veyrunes F. Unusual Mammalian Sex Determination Systems: A Cabinet of Curiosities. Genes (Basel) 2021; 12.

5 Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, *et al.* Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 2003; 426: 291-5.

6. Pitetti JL, Calvel P, Romero Y, *et al.* Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003160.

7. Chassot AA, Bradford ST, Auguste A, *et al.* WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development* 2012; 139: 4461-72.

8. Pelletier J, Bruening W, Li F, *et al.* WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 1991; 353: 431-4.

9. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, *et al.* Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 2001; 106: 319-29.

10. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994; 77: 481-90.

11. Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, *et al. Cell*-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 1610-9.

12. Bashamboo A, Eozenou C, Rojo S, McElreavey K. Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development. *Clin Genet* 2017; 91: 143-56.

13. Domenice S, Machado AZ, Ferreira FM, *et al.* Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. Birth Defects Res C Embryo Today 2016; 108: 309-20.

14. Sinclair A, Berta P, Palmer M, *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346: 240-4.

15. Wagner T, Wirth J, Meyer J, *et al.* Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *Sry*-related gene SOX9. *Cell* 1994; 79: 1111-20.

16. Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, *et al.* Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 2004; 131: 1891-901.

17. Vidal V, Chaboissier M, de Rooij D, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 2001; 28: 216-7.

18. Lavery R, Lardenois A, Ranc-Jianmotamedi F, *et al.* XY Sox9 embryonic loss-of-function mouse mutants show complete sex reversal and produce partially fertile XY oocytes. *Dev Biol* 2011; 354: 111-22.

19. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of *Sry* and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 2008; 453: 930-4.

20. Gonen N, Futtner CR, Wood S, *et al.* Sex reversal following deletion of a single distal enhancer of. *Science* 2018; 360: 1469-73.

21. Elzaiat M, Jouneau L, Thépot D, *et al.* High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats. *Biol Reprod* 2014; 91: 153.

22. Murphy MW, Lee JK, Rojo S, *et al.* An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22: 442-51.

23. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, *et al.* Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397: 405-9.

24. Parma P, Radi O, Vidal V, *et al.* R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006; 38: 1304-9.

25. Chassot A, Ranc F, Gregoire E, *et al.* Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1264-77.

26. Kocer A, Pinheiro I, Pannetier M, *et al.* R-spondin1 and FOXL2 act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 36.

27. Chassot AA, Gillot I, Chaboissier MC. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Reproduction* 2014; 148: R97-110.

28. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, *et al*. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1171-81.

29. Schmidt D, Ovitt C, Anlag K, *et al*. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 2004; 131: 933-42.

30. Boulanger L, Pannetier M, Gall L, *et al*. FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. Curr Biol 2014; 24: 404-8.

31. Pannetier M, Chassot AA, Chaboissier MC, Pailhoux E. Involvement of FOXL2 and RSPO1 in Ovarian Determination, Development, and Maintenance in Mammals. Sex Dev 2016; 10: 167-84.

32. Jolivet G, Daniel-Carlier N, Harscoët E, *et al*. Fetal Estrogens are not Involved in Sex Determination But Critical for Early Ovarian Differentiation in Rabbits. *Endocrinology* 2022; 163.

33. Le Rolle M, Massa F, Siggers P, *et al*. Arrest of WNT/□-catenin signaling enables the transition from pluripotent to differentiated germ cells in mouse ovaries. *EMBO J* 2021; 118.

34. Uhlenhaut N, Jakob S, Anlag K, *et al*. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 2009; 139: 1130-42.

35 McElreavey K, Jorgensen A, Eozenou C, *et al*. Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase DHX37 are a frequent cause of 46,XY gonadal dysgenesis and 46,XY testicular regression syndrome. *Genet Med* 2020; 22: 150-9.

36. Karaca E, Harel T, Pehlivan D, *et al*. Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. *Neuron* 2015; 88: 499-513.

37. Priya K, Setty M, Babu UV, Pai KSR. Implications of environmental toxicants on ovarian follicles: how it can adversely affect the female fertility? *Environ Sci Pollut Res Int* 2021; 28: 67925-39.

38. Jorgensen A, Svingen T, Miles H, *et al*. Environmental Impacts on Male Reproductive Development: Lessons from Experimental Models. *Horm Res Paediatr* 2021: 303-19.

Annexe 3

Méthodologie du ChIP-sequencing

Méthodologie du ChIP-sequencing

I. Matériel de départ

Le ChIP-seq a été réalisé à partir de 50 testicules et 50 ovaires contrôles prélevés à 28 j*pc*. Ces prélèvements ont été obtenus en association au projet de thèse d'Elodie Debras (UMR BREED) visant à extraire les fœtus de lapin à ce stade de gestation afin d'étudier la cicatrisation utérine chez les mères.

II. Méthodologie expérimentale

Le protocole est dérivé de celui du kit « Low Cell ChIPseq » (Active Motif, 53084). Les gonades de 28 j*pc* ont été broyées à froid en utilisant un mortier refroidi par de l'azote liquide (Bel-Art, H37260-0100). Les tissus ont ensuite été immédiatement fixés dans du PBS/1% formaldéhyde pendant 20 minutes à température ambiante. La fixation a été arrêtée par une solution de glycine fournie dans le kit. Après lavage en PBS, le tissu a été homogénéisé avec un Ultra Turrax pendant 30 secondes à 9 000 rpm. La lyse des cellules a été complétée dans un homogénéiseur de type « Dounce » (piston serré), entre 10 et 30 coups. Les noyaux ont été observés au microscope en utilisant une solution de colorant Azur II (10 mg/ml). Après centrifugation pendant 1 minute à 13 000 rpm, les noyaux ont été repris dans du tampon de sonication (1 mM EDTA, 10 mM Tris pH7.6, 0.1% SDS, 1X PIC Roche).

La sonication a été effectuée dans un Covaris E220 Evolution avec des microTUBE-500 AFA (520185) selon les conditions suivantes : Peak Power 75W ; Duty factor 10.0 ; Cycle/Burst 200 ; Time 600 secondes.

Avant l'immunoprécipitation, un aliquote de 25 µl de chromatine a été prélevé pour quantification et pour les inputs puis complété à 200 µl avec du tampon TE pH8.0. Trois incubations successives ont été réalisés sur ces aliquotes : 1h à 37°C avec 2 µl de RNAse A (10 mg/ml) ; 3h à 37°C après ajout de 5 µl de protéinase K ; 12h à 65°C après ajout de 10 µl de NaCl 5M. Les ADN ont ensuite été purifiés par phénol/chloroforme puis chloroforme et précipités avec 1 µl de glycogène Roche. Ces ADN ont été quantifiés au NanoDrop.

Pour chaque immunoprécipitation, un volume de chromatine correspondant à 20 µg d'ADN purifié a été utilisé. Ce volume a été dilué dans 5 volumes de tampon d'IP d'Active Motif. Pour chaque facteur de transcription d'intérêt, l'immunoprécipitation a été réalisée en

duplicat avec un anticorps anti-DMRT1 (Krentz *et al*, 2013), un anti-SOX9 (Gasca *et al*, 2002) et un anti-FOXL2 (Francis Poulat). La suite du protocole suit celui du kit « Low Cell ChIPseq » pour l'immunoprécipitation et la préparation des banques.

III. Traitement bio-informatique des données de séquençage

A) Pré-traitement et alignement

Les librairies ont été préparées avec le kit Next Gen DNA Library (Active Motif) contenant des identifiants moléculaires (MIDs) utilisés pour enlever les duplicats de PCR des données de séquençage. Après le séquençage, trois fichiers fastq ont été obtenus : deux contenant les séquences génomiques (sample.R1.fastq.gz et sample.R2.fastq.gz) et un contenant les MIDs associés (sample.UMI.fastq.gz). Le traitement des données a été fait en suivant le protocole fourni par Active Motif.

1. Extraction des MID

En utilisant un script **perl**, les séquences des MID du fichier sample.UMI.fastq.gz ont été ajoutées à l'en-tête des reads contenus dans les fichiers sample.R1.fastq.gz et sample.R2.fastq.gz.

2. Alignement

Les reads ont été alignés sur le génome lapin *Oryctolagus cuniculus* (assemblage OryCun2.0 amélioré au laboratoire) en utilisant **Bowtie2** (Langmead & Salzberg, 2012) v2.4.4 avec les paramètres par défaut sauf pour « -X 2000 ». Le nombre de reads alignés est représenté dans le tableau ci-dessous.

Sample name	raw pairs	aligned pairs	multimapped pairs	unmapped pairs
EMDJ10_SOX9_testis_2	26,680,906	21146533 (79.26%)	2930612 (10.98%)	2603761 (9.76%)
EMDJ11_FOXL2_ovaire_1	32,723,010	25475547 (77.85%)	3539448 (10.82%)	3708015 (11.33%)
EMDJ12_FOXL2_ovaire_2	31,996,685	24683020 (77.14%)	3470840 (10.85%)	3842825 (12.01%)
EMDJ15_inputs_testis	46,805,453	37410450 (79.93%)	5451225 (11.65%)	3943778 (8.43%)

EMDJ16_inputs_ovaire	38,303,150	30110484 (78.61%)	4417748 (11.53%)	3774918 (9.86%)
EMDJ5_DMRT1_testis_1	40,135,643	31276813 (77.93%)	4469509 (11.14%)	4389321 (10.94%)
EMDJ6_DMRT1_testis_2	19,728,722	15489178 (78.51%)	2283050 (11.57%)	1956494 (9.92%)
EMDJ7_DMRT1_ovaire_1	52,196,039	40572427 (77.73%)	6215921 (11.91%)	5407691 (10.36%)
EMDJ8_DMRT1_ovaire_2	34,831,435	26827385 (77.02%)	4293461 (12.33%)	3710589 (10.65%)
EMDJ9_SOX9_testis_1	23,161,844	17791092 (76.81%)	2494778 (10.77%)	2875974 (12.42%)

Raw : nombre de paires de reads séquencés ; Aligned : nombre de paires de reads uniques alignés ; Multimapped : nombre de paires de reads alignés plus d'une fois ; Unmapped : nombre de paires de reads non alignés.

3. *Suppression des duplicats de PCR*

L'outil **rmDupByMids.pl** fourni par Active Motif a été utilisé pour enlever les reads dupliqués.

4. *Filtrage de la qualité d'alignement*

Les reads avec une qualité d'alignement inférieure à 10 ont été enlevés avec l'outil **samtools** v1.15.1 (Li *et al*, 2009) avec la ligne de commande 'samtools view -b -q 10'. Le nombre de reads après les étapes de pré-traitement est indiqué dans le tableau ci-dessous.

Sample name	Mapped reads (step 2.2)	Deduplicated reads (step 2.3)	Deduplicated and Good quality reads (step 2.4)
EMDJ10_SOX9_testis_2	48,154,290	47,065,906	43,069,392
EMDJ11_FOXL2_ovaire_1	58,029,990	56,843,862	51,944,502
EMDJ12_FOXL2_ovaire_2	56,307,720	54,848,272	50,095,836
EMDJ15_inputs_testis	85,723,350	83,964,522	76,561,752
EMDJ16_inputs_ovaire	69,056,464	68,026,650	61,892,244
EMDJ5_DMRT1_testis_1	71,492,644	69,689,398	63,548,888
EMDJ6_DMRT1_testis_2	35,544,456	34,450,846	31,342,214
EMDJ7_DMRT1_ovaire_1	93,576,696	91,084,570	82,662,194
EMDJ8_DMRT1_ovaire_2	62,241,692	60,428,054	54,651,544
EMDJ9_SOX9_testis_1	40,571,740	39,957,160	36,449,018

Afin de visualiser les données, les fichiers BigWig ont été générés en utilisant l'outil **Deeptools ban Coverage** (Ramírez *et al*, 2016) v3.5 avec les paramètres suivants '-bs 10 -normalizeUsing CPM -effectiveGenomeSize 2395757213 -skipNonCoveredRegions -extend Reads'.

Ces fichiers ainsi que le fichier .gtf du génome lapin (assemblage OryCun 2.0 ammélioré) ont été visualisés sur le logiciel **IGV**_2.16.2 (Integrative Genomic Viewer) (Robinson *et al*, 2011).

C) Identification des pics

L'identification des pics ou « peak calling » a été réalisée en utilisant le pipeline **Encode ChIP-seq** v2.0.1 pour chaque condition. Les pics retenus sont ceux avec un IDR (Irreproducibility Discovery Rate) optimal, c'est-à-dire reproductibles entre les deux immunoprécipitations pour chaque condition.

D) Annotation des pics

Les pics ont été annotés par rapport aux caractéristiques génomiques en utilisant **Homer** v4.11.1 (Heinz *et al*, 2010).

E) Analyse de l'ontologie des gènes associés aux pics

Afin de savoir les fonctions biologiques et les voies de signalisation dans lesquelles les gènes cibles sont impliqués, les identifiants Ensembl de chacun d'entre eux ont été annotés fonctionnellement avec l'outil **DAVID** (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, https://david.ncifcrf.gov/), v2021 (Huang *et al*, 2009). Les analyses se sont basées sur les données de 'Gene Ontology:Biological Process' en utilisant les critères par défauts. Chaque terme avec un score d'enrichissement supérieur à 1.3 a été pris en compte.

COMMUNICATIONS

Liste des communications

Communications orales :

Dujardin E., André M., Dewaele A., Mandon-Pépin B., Poulat F., Thépot D., Frambourg A., Jouneau L., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. ***« DMRT1 is Required For Sex Determination in Rabbits »***.
16th RQR Symposium, Octobre 2023, Québec, Canada – Participation financée par le RQR

Dujardin E., André M., Dewaele A., Mandon-Pépin B., Poulat F., Thépot D., Frambourg A., Jouneau L., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. ***« DMRT1, un gène du déterminisme sexuel chez le lapin ».***
Journées Reprosciences, Mai 2023, Paris, France – Prix de la meilleure présentation orale

Dujardin E., André M., Dewaele A., Mandon-Pépin B., Poulat F., Thépot D., Frambourg A., Jouneau L., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. ***« DMRT1 is a Sex Determining Gene in Rabbits ».***
9th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, Avril 2023, Kona, USA – Prix pour la participation au congrès

Dujardin E. ***« Rôle de DMRT1 dans la détermination du sexe et le maintien de la fertilité chez les males – Analyse du phénotype de lapins mutants pour DMRT1 ».***
Journée des doctorants de l'unité BREED, Décembre 2022, Jouy-en-Josas, France – Prix de la meilleure présentation orale

Dujardin E., André M., Dewaele A., Mandon-Pépin B., Mellouk N., Thépot D., Frambourg A., Jouneau L., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. ***« DMRT1 is Required for Sex Determination in Rabbits ».***
2nd European Symposium of Sex Determination in Vertebrates, Octobre 2022, Giens, France

Dujardin E., Mellouk N., André M., Mandon-Pépin B., Dewaele A., Canon E., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. ***« DMRT1 is Required for Sex Determination in Rabbits ».***
HUGODECA meeting, Mai 2022, Paris, France

Dujardin E., Mellouk N., André M., Mandon-Pépin B., Dewaele A., Canon E., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. ***« Rôle de DMRT1 dans la détermination du sexe chez le lapin ».***
Colloque DiGoV (différenciation des gonades chez les vertébrés), Avril 2022, Paris, France

Dujardin E., Mellouk N., André M., Mandon-Pépin B., Dewaele A., Canon E., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. ***« DMRT1 is a Sex-Determining Gene in Rabbits ».***
SSR 54th annual meeting, Reproductive Biology:Solutions for adult disease, Décembre 2021, Saint Louis, USA (virtuel) – Prix du meilleur résumé international

Dujardin E. ***« Rôle de DMRT1 dans la détermination du sexe et le maintien de la fertilité chez les males – Analyse du phénotype de lapins mutants pour DMRT1 ».***
Journée des doctorants de l'unité BREED, Novembre 2021, Jouy-en-Josas, France – Prix de la meilleure présentation orale

Dujardin E., Mellouk N., André M., Mandon-Pépin B., Dewaele A., Canon E., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. ***« DMRT1 is Required for Sex Determination in Rabbits ».***
First Virtual International Symposium on Vertebrate Sex Determination, Octobre 2021 (virtuel)

Dujardin E. ***« Rôle de DMRT1 dans la détermination du sexe et le maintien de la fertilité chez les males – Analyse du phénotype de lapins mutants pour DMRT1 ».***
Journée des doctorants de l'unité BREED, Novembre 2020, Jouy-en-Josas, France

Communications affichées :

Barka I., Dujardin E., Dewaele A., André M., Mandon-Pépin B., Pannetier M., Jolivet G., Pailhoux E. **« Implication de la signalisation de l'acide rétinoïque (ATRA) et de DMRT1 dans le devenir des cellules germinales mâles et femelles chez le lapin ».**
Journées Reprosciences, Mai 2023, Paris, France

Barka I., Dujardin E., Dewaele A., André M., Mandon-Pépin B., Pannetier M., Jolivet G., Pailhoux E. **« Involvment of retinoic acid (ATRA) signaling and DMRT1 in rabbit male and female germ cell fates ».**
9th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, Avril 2023, Kona, USA

Mellouk N., Mandon-Pépin B., Dewaele A., Jouneau L., Dujardin E., Frambourg A., Morin G., Congar P., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. **« CAROT – Cell Atlas of Rabbit Ovarian Transcripts ».**
Journée d'animation scientifique PHASE, Mai 2022, Poitiers, France

Dewaele A., Dujardin E., Jammes H., Giton F., Mandon-Pépin B., Sellem E., André M., Albina A., Pailhoux E., Jolivet G., Pannetier M. **« Characterization of estrogen production and function in adult rabbit testes ».**
SSR 54th annual meeting, Reproductive Biology:Solutions for adult disease, Décembre 2021, Saint Louis, USA (virtuel)

Mellouk N., Mandon-Pépin B., Dewaele A., Jouneau L., Dujardin E., Frambourg A., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. **« Single-cell RNA Transcriptome Atlas of the Developing Fetal Rabbit Ovary ».**
SSR 54th annual meeting, Reproductive Biology:Solutions for adult disease, Décembre 2021, Saint Louis, USA (virtuel)

Mellouk N., Dujardin E., Jolivet G., Dewaele A., Pailhoux E., Pannetier M. **« DMRT1 is Required for Fetal Germ Cell Development in Rabbit Ovary ».**
SSR 54th annual meeting, Reproductive Biology:Solutions for adult disease, Décembre 2021, Saint Louis, USA (virtuel)

Mellouk N., Mandon-Pépin B., Dewaele A., Jouneau L., Dujardin E., Frambourg A., Jolivet G., Pailhoux E., Pannetier M. **« Single-cell RNA Transcriptome Atlas of the Developing Fetal Rabbit Ovary ».**
First Virtual International Symposium on Vertebrate Sex Determination, Octobre 2021 (virtuel)

Mellouk N., Dujardin E., Jolivet G., Dewaele A., Pailhoux E., Pannetier M. **« DMRT1 is Required for Fetal Germ Cell Development in Rabbit Ovary ».**
First Virtual International Symposium on Vertebrate Sex Determination, Octobre 2021 (virtuel)