



HAL
open science

Etude des récepteurs des oestrogènes et des androgènes chez l'amphibien "Pleurodeles waltl." : Intérêts pour la différenciation du sexe et l'impact des perturbateurs endocriniens

Chia-I Ko

► **To cite this version:**

Chia-I Ko. Etude des récepteurs des oestrogènes et des androgènes chez l'amphibien "Pleurodeles waltl." : Intérêts pour la différenciation du sexe et l'impact des perturbateurs endocriniens. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT: 2008NAN10110. tel-01748522

HAL Id: tel-01748522

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748522>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré Nancy I

En Biologie Cellulaire

Par Chia-I KO

Etude des récepteurs des oestrogènes et des androgènes chez l'amphibien *Pleurodeles waltl*.

Intérêts pour la différenciation du sexe et l'impact des perturbateurs endocriniens.

Soutenance publique prévue le 17 Décembre 2008 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Eric PAILHOUX	Directeur de recherche, INRA Jouy-en-Josas
	M. René HABERT	Professeur, Université Paris VII
Examineurs :	M. Jean-François BAROILLER	Chargé de recherche, CIRAD-EMVT
	M. Lucien HOFFMANN	Professeur, CRP Luxembourg
	M. Marc DIEDERICH	Docteur, Luxembourg
	M. Stéphane FLAMENT	Professeur, UHP Nancy I (Directeur de thèse)

Sommaire

Abréviations

I. <i>Pleurodeles waltl</i>.....	1
I.1 Description du modèle animal.....	1
I.1.1 Mode de reproduction et principales caractéristiques biologiques.....	1
I.1.2 Stades du développement larvaire.....	2
I.2 Détermination du sexe.....	2
I.3 Inversions sexuelles.....	4
II. Différenciation des gonades	6
II.1 Différenciation ovarienne.....	6
II.2 Différenciation testiculaire.....	9
II.3 Les acteurs de la différenciation des gonades.....	10
III. Implications des stéroïdes et de leurs récepteurs dans la différenciation du sexe.....	15
III.1 Hormones stéroïdiennes.....	15
III.1.1 Stéroïdogénèse.....	15
III.1.2 Stéroïdes et différenciation gonadique.....	16
III.1.2a Oestrogènes.....	16
III.1.2b Androgènes.....	18
III.1.2c Stéroïdes extragonadiques.....	19
III.1.2d Stéroïdes et différenciation du tractus génital.....	19
III.2 Récepteurs des hormones stéroïdiennes.....	21
III.2.1 Description des récepteurs stéroïdiens.....	21
III.2.1a Structure.....	21
III.2.1b Mécanisme de fonctionnement.....	22
III.2.2 Récepteurs des oestrogènes (ERs).....	23
III.2.2a Les différentes isoformes.....	23
III.2.2b Régulation de l'expression d'ERs.....	24
III.2.2c Spécificité et mécanismes de fonctionnement.....	26
- Les co-facteurs.....	27
- Les mécanismes non classiques.....	29
III.2.2d Expression d'ERs dans la différenciation gonadique.....	30
III.2.3 Récepteurs des androgènes (AR).....	32
III.2.3a Evolution et spécificité structurale.....	32
III.2.3b Mécanisme de fonctionnement.....	34
III.2.3c Expression, distribution tissulaire et fonction dans la gonadogenèse.....	35
IV. Impacts des perturbateurs endocriniens sur la différenciation du sexe.....	38
IV.1 Terminologie.....	38
IV.2 Perturbateurs endocriniens et reproduction.....	39
IV.3 Méthodes d'identification des EDC.....	41
IV.4 Mécanismes d'action des EDCs.....	42
IV.4.1 Les oestrogène-mimétiques <i>via</i> les ERs.....	43

IV.4.2 Les anti-androgènes <i>via</i> l'AR.....	43
IV.4.3 Voies indépendantes des récepteurs des stéroïdes sexuels.....	44
IV.4.4 Les agonistes du AhR (aryl hydrocarbon receptor, AhR).....	45
V. Hypothèses et objectifs de la thèse.....	46
VI. Résultats.....	48
VI.1 Effets des hormones stéroïdiennes et de polluants sur la différenciation du sexe du pleurodèle.....	50
<u>Article 1</u> : Ethynylestradiol causes ferminization in the urodele amphibian <i>Pleurodeles waltl</i> with a higher potency than 17 β -estradiol. Ko <i>et al.</i>	
VI.2 Récepteur des oestrogènes et différenciation sexuelle du pleurodèle.....	48
VI.2.1 Echantillons larvaires de pleurodèle.....	50
VI.2.2 Mises au point des techniques.....	50
- Hybridation <i>in toto</i>	50
- PCR en temps réel.....	53
- Production des protéines recombinantes et d'immun-sérums.....	56
VI.2.3 Clonage d'ER α et analyse de son expression au cours de la différenciation gonadique.....	59
<u>Article 2</u>	
Female-enriched expression of ERalpha during gonad differentiation of the urodele amphibian <i>Pleurodeles waltl</i> . Ko <i>et al.</i> , Gen Comp Endocrinol. 2008 Apr 1;156(2):234-45.	
<u>Article 3</u>	
Sexual development of the urodele amphibian <i>Pleurodeles waltl</i> . Dumond <i>et al.</i> Sex Dev. 2008;2(2):104-14.	
VI.3 Régulation transcriptionnelle d'ERα et sensibilité d'ERα aux hormones stéroïdiennes.....	63
VI.3.1 Matériels et méthodes.....	63
- Cultures cellulaires.....	63
- Transfection.....	63
- Mutagenèse.....	64
VI.3.2 Implication du facteur CTCFL/BORIS dans la régulation de l'expression d'ER α de pleurodèle.....	65
VI.3.3 Expression d'ER α et de l'aromatase sous l'influence des hormones stéroïdiennes.....	66
VI.4 Récepteur des androgènes (AR) et sa sensibilité aux hormones stéroïdiennes chez le pleurodèle.....	68
VI.4.1 Isolement du cDNA du récepteur des androgènes.....	68
VI.4.2 Expression du récepteur des androgènes chez le pleurodèle.....	69
- Dans les tissus adultes.....	69
- Au cours de la différenciation gonadique.....	70
VII. Discussion, conclusion et perspectives.....	72
VIII. Références bibliographiques.....	82

Annexes

Abréviations

17 β HSD	17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
3 β HSD	3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
4OP	4-octylphénol
5'UTR	5'-untranslated region
AD1	activation domain 1
AD2	activation domain 2
ADN	acid desoxyribonucleic
AF1	transactivation domain 1
AF2	transactivation domain 2
AHC	Adrenal Hypoplasia Congenita
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AMH	Anti-Müllérienne hormone
AMPc	adenosine monophosphate cyclic
AP1	Activator protein 1
AR	récepteurs des androgènes
ARE	Androgen Response Element
ARN	acid ribonucleic
ARNT	AhR nuclear translocator
BPA	bisphénol-A
CARM	coactivator-associated arginine methyltransferase
COUP-TF1	chicken ovalbumin upstream promoter – transcription factor 1
CTCFL/BORIS	CCCTC binding factor / brother of the regulator of imprinted sites
CTD	C-terminal domain
CTE	C-Terminal Extension
Dax1	DSS-AHC critical region on the X gene 1
DBD	DNA Binding Domain
DDE	dichlorodiphényl dichloroéthylène
DDT	dichlorodiphényl trichloroéthane
DHT	dihydrotestostérone
Dmrt1	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
DM-W	DM-domain gene on the W chromosome
DMY	DM-domain gene on the Y chromosome
DSS	Dosage Sensitive Sex reversal
E ₂	estradiol
EE ₂	ethynylestradiol
EDCs	endocrine disruption chemicals
EGF	epidermal growth factor
ERs	Récepteurs des oestrogènes

ERE	estrogen response element
Fog2	Feminization of Germline 2
Foxl2	Forkhead domain box L2
FSH	follicle-stimulating hormone
GR	glucocorticoid receptor
HAT	histone acetyl transferase
HSP70	heat shock protein 70
HSP90	heat shock protein 90
IGF-1	insulin-like growth factor 1
KO	knockout
LBD	Ligand Binding Domain
LH	Luteinizing hormone
MeCP2	méthyl cytosine binding protein 2
MR	minercorticoid receptor
MXC	methoxychlor
NRDC	Natural Resources Defense Council
NTD	N-terminal domain
PAH	polyaromatic hydrocarbons
PBDE	polybrominated diphenyl ether
PCBs	polychlorobiphenyl
PR	progesterone receptor
PRK1	PKC related kinase1
PRMRTs	protéine arginine méthyltransférases
REA	repressor of estrogen receptor activity
Rspo1	R-spondin 1
SCC	Side Chain Clivage
Sf1	Steroidogenic factor 1
Sox9	SRY box 9
SRA	steroid receptor RNA activator
SRC	steroid receptor coactivator
Tau-1	Transcription activation unit 1
Tau-5	Transcription activation unit 5
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzyl- <i>p</i> -dioxin
Tfm	testicule féminisation mutation
TRAP/DRIP	Thyroid Hormone Receptor Associated Protein/Vitamine D receptor – integrating protein
WHO	world health organization
Wnt4	Wingless-type MMTV and integration site family, member 4

I. *Pleurodeles waltl*



Figure I-1. Amplexus dorso-ventral de pleurodèle. Le mâle se positionne sous la femelle et l'agrippe par les membres antérieurs.

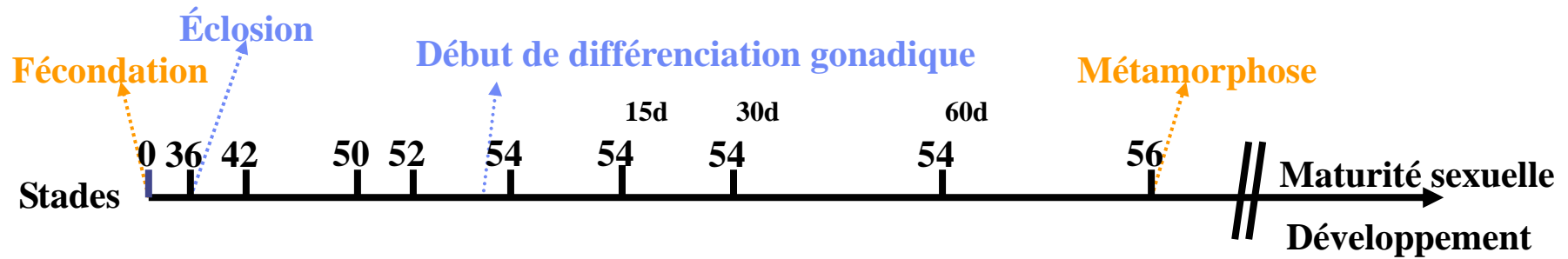
I. *Pleurodeles waltl*

I.1 Description du modèle animal

I.1.1 Mode de reproduction et principales caractéristiques biologiques

Le pleurodèle est un amphibien urodèle de la famille des salamandridés. Il vit en Afrique du nord, au sud du Portugal et de l'Espagne. Les larves et les adultes mènent une vie essentiellement aquatique. La longévité peut atteindre une dizaine d'année et la maturité sexuelle est observée entre 12 et 18 mois. C'est une espèce gonochorique. Les mâles se distinguent des femelles par une silhouette plus fine, un cloaque turgescent en raison du développement de gonades cloacales et enfin par la présence de pelotes copulatrices sur les bras. Ces caractères sexuels secondaires ne sont développés que lors de la période de reproduction. La plupart des urodèles se reproduisent pendant une seule période de l'année, le plus souvent au printemps ou en été, parfois en automne ou en hiver. Pour la race de pleurodèle vivant au Maroc, la ponte pourrait n'avoir lieu qu'à la saison des pluies en janvier et en février (Pasteur G et Bons J 1959). Les facteurs externes qui déclenchent les phases de la période de reproduction sont la température et la lumière.

Lorsque les mâles sont arrivés sur les lieux de ponte, ils cherchent les femelles et le processus de l'acte de reproduction s'engage. Suivant les cas, il s'écoule quelques jours ou quelques semaines entre ces deux phénomènes. Chez le pleurodèle, le comportement sexuel se caractérise par un amplexus dorso-ventral (Fig. I-1). Après quelques temps lorsqu'on réunit des couples dans un aquarium, le mâle s'approche de la femelle, la touche avec son museau puis se glisse sous elle et l'immobilise en enroulant ces membres antérieurs autour des membres antérieurs de sa partenaire. Le couple ainsi formé peut rester de longues minutes immobile, ou se déplacer par moment (Joly J 1966). L'enlacement peut durer quelques heures, cesser, puis reprendre. Le rôle de l'amplexus dorso-ventral est difficile à déterminer.



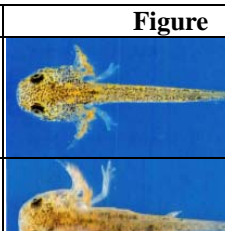
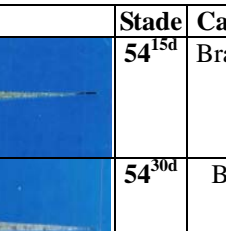
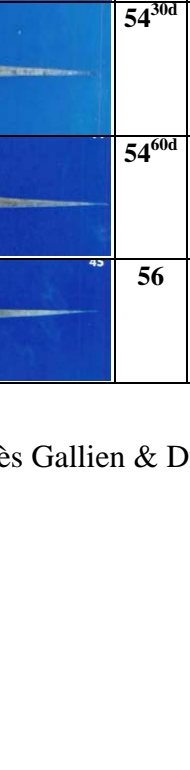
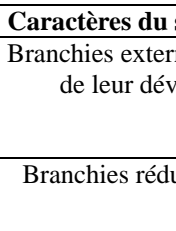
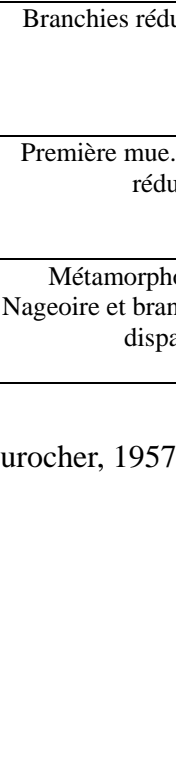
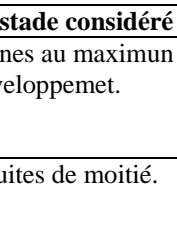
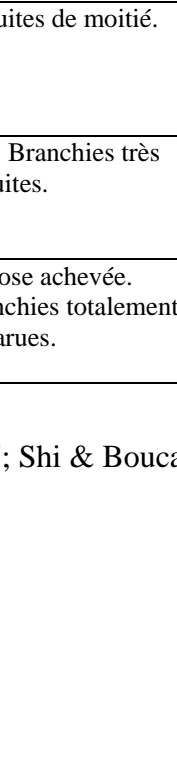
Stade	Caractères du stade considéré	Longueur(mm)	Figure	Stade	Caractères du stade considéré	Longueur(mm)	Figure
42	Trois doigts bien formés au membre antérieur.	16±1		54 ^{15d}	Branchies externes au maximum de leur développement.	44±5	
50	Ebauche de troisième doigt au membre postérieur.	23±2		54 ^{30d}	Branchies réduites de moitié.	60±8	
52	Quatre doigts bien formés au membre postérieur.	27±3		54 ^{60d}	Première mue. Branchies très réduites.	65±8	
54	Cinq doigts bien formés au membre postérieur.	38±5		56	Métamorphose achevée. Nageoire et branchies totalement disparues.	72±10	

Tableau I-1. Développement larvaire de *Pleurodeles waltl*. (D'après Gallien & Durocher, 1957; Shi & Boucaut, 1995)

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

Dans le laboratoire de Nancy, les adultes sont élevés dans l'eau du robinet à 20°C. La période de reproduction s'étale de Septembre à Avril. Les accouplements sont effectués dans des aquariums dont le fond est couvert de cailloux en plaçant un mâle et une femelle. Les cailloux servent de support pour les spermatophores déposés par le mâle puis pour les œufs déposés par la femelle.

I.1.2 Stades du développement larvaire

La période larvaire comprend deux phases : 1) stades initiaux, allant de l'éclosion jusqu'à la prise de nourriture (stades 35 à 38), au cours de cette phase le vitellus achève d'être résorbé ; 2) vie larvaire active, elle dure jusqu'à l'achèvement de la métamorphose. Une table du développement du pleurodèle basée sur des critères morphologiques est utilisée pour caractériser les différents stades (Tableau I-1) (Gallien L. & Durocher M. 1957). Le stade 55, pendant lequel s'effectue la métamorphose, durant 3 mois, il est divisé en stades 54+15 jours (54^{15d}), +30 jours (54^{30d}) et +60 jours (54^{60d}).

I.2 Détermination du sexe

Chez la plupart des espèces de vertébrés, le sexe est déterminé par la présence de chromosomes sexuels : on distingue le type XX/XY bien connu chez les mammifères et le type ZZ/ZW présent chez certaines espèces d'amphibiens, de reptiles et chez les oiseaux. Dans ce système, le sexe femelle est déterminé par le chromosome W chez certaines espèces alors que chez d'autres, il est déterminé par la dose de chromosome Z. Il n'est pas exclu que

les deux modes puissent coexister chez certaines espèces.

Souvent, le déterminisme génétique consiste en un gène dominant lié au chromosome hétérogamétique et initiant la différenciation gonadique, c'est le cas du gène Sry chez les mammifères (Sinclair *et al.* 1990). Récemment une région de 530kb, située sur le chromosome Y du medaka *Oryzias latipes*, a été identifiée, elle contient un gène nommé DMY (the DM-domain gene on the Y chromosome, DMY), qui comme Sry, est nécessaire et suffisant à la détermination testiculaire de ce poisson (Matsuda *et al.* 2002; Matsuda *et al.* 2007). Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, dont la détermination du sexe est contrôlée par les chromosomes ZZ/ZW, un gène DM-W (the DM-domain gene on the W chromosome, DM-W) a été récemment identifié. L'expression de DM-W est transitoire et plus élevée pendant la détermination du sexe femelle ; des individus ZZ transgéniques, portant le gène DM-W, présentent des gonades à caractère ovarien (Yoshimoto *et al.* 2008). En dehors de ces gènes de la détermination du sexe, les gènes de la différenciation des gonades semblent très conservés chez les différentes espèces de vertébrés.

En dehors du contrôle génétique, la détermination du sexe chez certaines espèces est influencée par l'environnement, comme par exemple l'environnement social ou encore la température. Chez tous les crocodiles, beaucoup de tortues et quelques lézards, aucun déterminisme génétique n'est connu et le sexe de l'embryon est déterminé par la température d'incubation de l'oeuf (Bergeron *et al.* 1998). Chez les téléostéens, il existe des espèces hermaphrodites successifs chez lesquels le changement de sexe est déterminé par des facteurs sociaux (Baroiller & D'Cotta 2001). Chez d'autres espèces, la température se superpose à un déterminisme génétique et provoque l'inversion sexuelle de l'un des deux sexes, c'est le cas par exemple chez quelques amphibiens comme *Triturus cristatus* (Wallace & Wallace 2000) ou *Pleurodeles waltl* (Dournon & Houillon 1985) et chez de nombreux téléostéens (Baroiller & D'Cotta 2001).

Ces facteurs environnementaux sont supposés avoir un effet sur la production des

stéroïdes sexuels, qui agiraient sur la différenciation du sexe. Chez le gecko *Eublepharis macularius*, une température élevée induit l'augmentation de DHT et la diminution de l'oestradiol, cet effet de la température se traduit par une différenciation gonadique mâle (Rhen *et al.* 2005).

Le sexe chez le pleurodèle est déterminé par la présence des chromosomes sexuels Z et W. L'homogamétie mâle ZZ a été démontrée à partir des expériences d'inversion sexuelle obtenue sous l'effet de l'oestradiol (Gallien 1951; Gallien 1954). Le croisement de mâle standard (ZZ) avec les femelles issues des mâles inversés par l'oestradiol (ZZ^{E2}) produit une descendance unisexuée mâle. La dominance du chromosome W chez les femelles a été démontrée par les expériences de descendance tétraploïde issue du croisement entre mâle diploïde et femelle triploïde (Beetschen 1967). Il est possible de déterminer le génotype sexuel chez le pleurodèle : deux formes de peptidase-1, dont les gènes sont portés par la zone différentielle des chromosomes sexuels, sont utilisées comme marqueur du génotype sexuel (Ferrier V. 1980).

Le sexe chez le pleurodèle est déterminé génétiquement par la présence des chromosomes sexuels ; mais la différenciation gonadique peut aussi être influencée par des facteurs environnementaux comme la température et/ou les hormones exogènes.

I.3 Inversions sexuelles

Une inversion sexuelle peut être obtenue en élevant des larves ZW à 32°C (ZW³²) lors d'une période larvaire dite thermosensible (Tableau I-1), du stade 42 au 54 (Gallien L. & Durocher M. 1957). Une autre méthode pour obtenir des inversions sexuelles est l'utilisation d'hormones stéroïdes, qui sont ajoutées à l'eau d'élevage. Lorsqu'ils sont traités au benzoate d'oestradiol (100µg/L), les individus ZZ se différencient en néo-femelles fertiles (ZZ^{E2}) (Gallien 1951). Un effet paradoxal a été décrit avec le traitement par la testostérone : elle est

capable de féminiser les larves ZZ (ZZ^{Testo}) (Chardard *et al.* 2003). La dihydrotestostérone (DHT), androgène non-aromatisable, peut quant à elle inverser le sexe des larves ZW (ZW^{DHT}) (Chardard *et al.* 2003).

A l'issue d'inversions sexuelles, nous disposons donc de néomâles (ZW^{32} , les individus ZW élevés à 32°C), de femelles arrhenogènes (ZZ^{E2} , les individus ZZ inversés par l'oestradiol). Nous disposons aussi de femelles thélygènes (WW, un quart de la descendance de deux parents de génotype ZW : $ZW^{32} \times ZW^{20}$). En conséquence, deux types de pontes unisexuées peuvent être obtenues : des pontes unisexuées mâles ZZ (descendance de deux parents de génotype ZZ : $ZZ \times ZZ^{E2}$) et des pontes unisexuées femelles ZW (descendance de deux parents de génotype ZZ et WW).

II. Différenciation des gonades

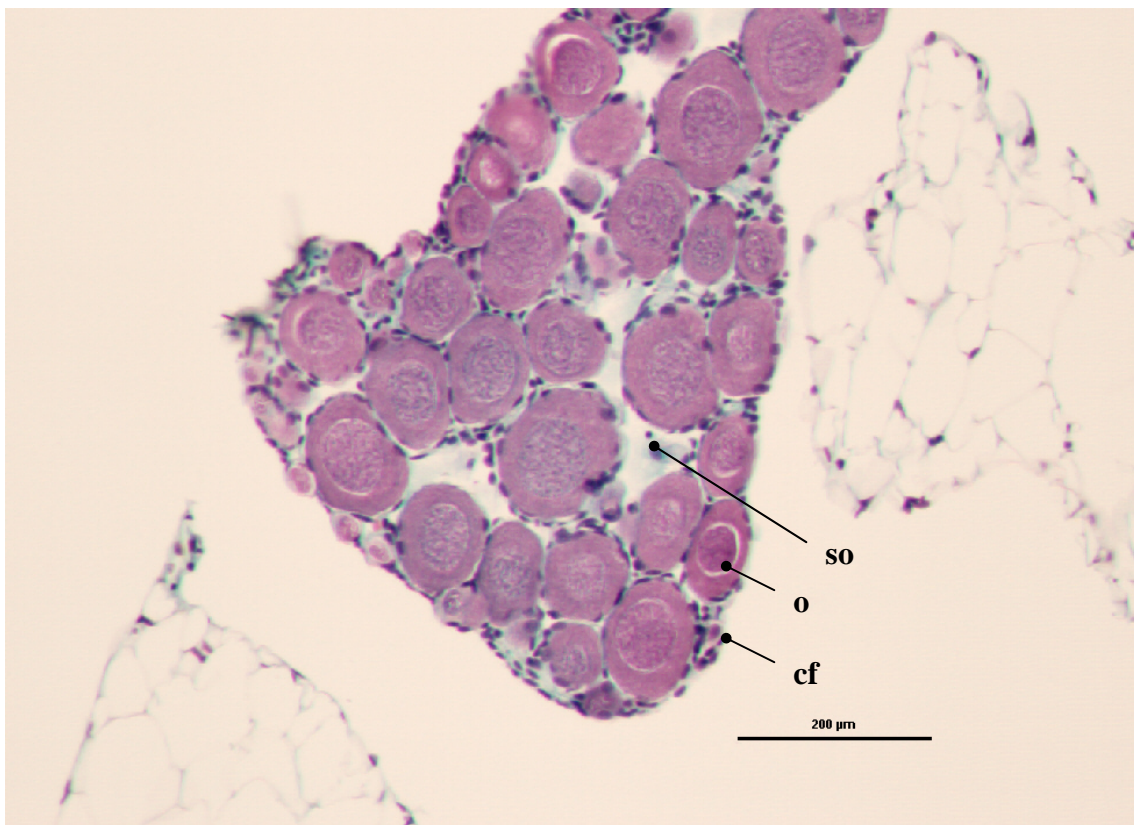


Figure II-1. Coupe histologique de l'ovaire juvénile de *Pleurodeles waltl*. Coloration hématoxyline – éosine. o – ovocyte ; cf – cellules folliculeuses ; so – sac ovarien.

II. Différenciation des gonades

Chez les vertébrés, les gonades se présentent initialement comme une paire d'ébauches bipotentielles. Les ébauches gonadiques sont constituées de trois parties : 1) l'épithélium germinale, qui deviendra le cortex gonadique ; 2) le mésenchyme qui formera le stroma et 3) le blastème mésonéphrétique qui constituera la médulla gonadique. Le développement des gonades se réalise à partir de trois constituants dont l'importance varie selon les espèces :

- les cellules germinales primordiales qui apparaissent dans un territoire extra-gonadique (endoderme, mésoderme extraembryonnaire) et qui vont coloniser les gonades ;
- l'épithélium coelomique qui prolifère ;
- un blastème mésenchymateux qui provient de l'épithélium coelomique et/ou du mésonéphros.

En général, au stade indifférencié, les ébauches du canal de Wolff et du canal de Müller sont déjà mises en place. A un moment donné du développement, la détermination va orienter la gonade vers l'un des deux sexes et des productions testiculaires ou ovariennes des hormones sexuelles vont permettre le développement d'un tractus génital adapté au sexe gonadique.

Par rapport à notre modèle du pleurodèle, les mécanismes de la différenciation du sexe sont mieux connus chez les mammifères, nous ne présenterons donc ici que le cas des mammifères et celui des amphibiens.

II.1 Différenciation ovarienne

Chez les amphibiens, on dit que le cortex a des potentialités femelles alors que la médulla a des potentialités mâles (Fig. II-1) (Hayes 1998). En effet, lors de la différenciation ovarienne, la partie corticale s'épaissit par la multiplication des cellules germinales primordiales. La majorité des cellules germinales primordiales (CGP) entrent en méiose et

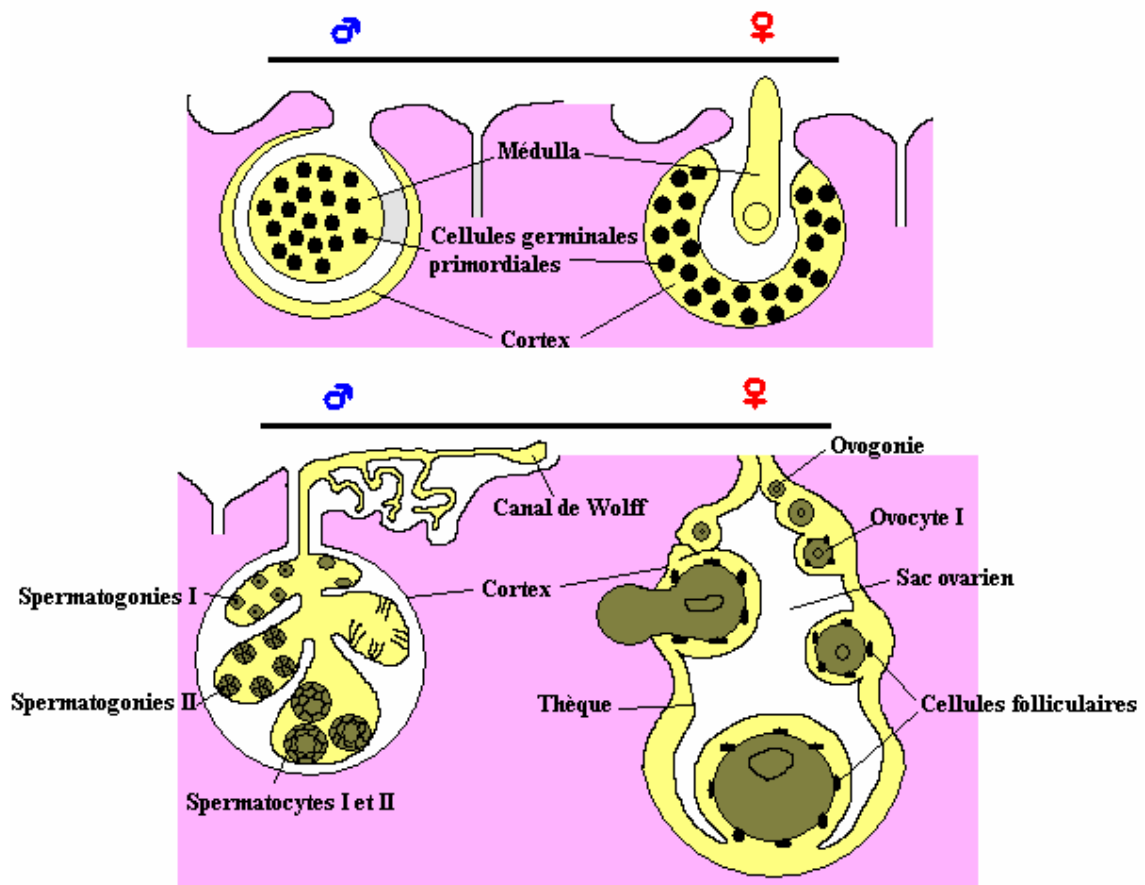


Figure II-2. Schémas des crêtes génitales peuplées par les cellules germinales chez les amphibiens. Pour le sexe femelle, le cortex s'épaissit avec les processus de l'ovogenèse et de la folliculogenèse, le médulla régresse au fur et à mesure ; alors que chez le mâle, les cellules germinales colonisent les cordons médullaires et le cortex forme l'albuginée.

s'arrêtent au stade diplotène de la prophase I. Elles constituent alors des ovocytes primaires et s'entourent de cellules folliculaires. Par contre le centre de la gonade, la médulla, régresse et se creuse, d'une cavité donnant à l'ovaire la forme d'un sac (ovisac) (Fig. II-1). Lors de la formation et du développement des follicules, une seule couche de cellules folliculaires tapisse l'ovocyte.

Chez les amphibiens, la médulla se développe en testicule, alors que la partie périphérique, le cortex, se développe en ovaire (Fig. II-2) (Hayes 1998). Il existe chez les amphibiens, un corps adipeux associé aux gonades. Chez les urodèles, l'ébauche du corps adipeux apparaît comme un plissement accessoire du pédicule gonadique, situé entre l'ébauche génitale et le mésentère dorsal (Grilli 1937). Il est colonisé par les cellules originaires du blastème sous-aortique, puis constitue une longue bandelette parallèle à la gonade, située entre cette dernière et le plan de symétrie bilatérale.

Après la métamorphose, l'ovogenèse se déroulera dans l'ovaire différencié. Elle comprend plusieurs étapes : 1) multiplication des ovogonies, 2) entrée en méiose et arrêt au stade diplotène de la phase I, 3) croissance des ovocytes I avant la vitellogenèse, 4) croissance pendant la vitellogenèse et 5) maturation. L'ovogenèse des amphibiens est caractérisée par un stade diplotène très long, au cours duquel les chromosomes sont très actifs (chromatine décondensée) et le cytoplasme devient le siège d'une vitellogenèse importante. Les ovocytes accumuleront en effet des réserves dérivées de la vitellogénine produite par les cellules hépatiques, réserves qui serviront au développement des embryons. La maturation ovocytaire chez les amphibiens est généralement suivie de la ponte des ovocytes mûrs (arrêtés en métaphase II), et la fécondation détermine l'achèvement du processus méiotique. Les ovocytes matures seront libérés dans la cavité abdominale et amenés jusqu'à l'entrée du canal de Müller différencié en oviducte sous l'effet des oestrogènes produits par l'ovaire. Il est à noter que le canal de Wolff persiste chez les femelles dont il assure l'évacuation urinaire.

L'ovogenèse est un processus continu chez les amphibiens, et le stock germinal se renouvelle chez l'animal adulte par multiplication des ovogonies. L'activité ovarienne est

généralement cyclique, chaque cycle se caractérisant par une vague de croissance ovocytaire suivie de la maturation de l'ensemble des ovocytes ayant achevé la vitellogenèse.

Chez certains urodèles, il est possible de réaliser des parabioses qui consistent en des associations de deux embryons au stade bourgeon caudal. Ces embryons peuvent se développer jusqu'à l'âge adulte comme des siamois avec une circulation sanguine croisée. Dans un système de parabiose associant les deux sexes génétiques ZZ et ZW chez *Pleurodeles waltl*, les gonades ZZ se différencient en testicules normaux ; alors que le développement de gonades ZW semble être altéré (Dumond *et al.* 2008). Ces gonades ZW possèdent moins de cellules germinales, qui ne rentrent pas en méiose par la suite. L'expression de l'ARN messager et l'activité de l'aromatase dans ces gonades ZW sont aussi réduites. En revanche, le compartiment somatique de ces gonades ZW n'est pas masculinisé, puisque l'expression du marqueur testiculaire chez l'adulte, *Dmrt1*, reste absente. La différenciation ovarienne du pleurodèle est donc inhibée par la présence d'un environnement hormonal mâle.

Chez les mammifères, les cellules germinales jouent un rôle primordial dans la différenciation et le développement précoce de l'ovaire (McLaren & Southee 1997). En effet, lors de traitements qui éliminent les cellules germinales (busulfan par exemple), il ne se forme pas de follicules. Au cours de vie fœtale, les cellules germinales entrent en méiose sous l'action de l'acide rétinoïque et s'arrêtent au diplotène de prophase I (Bowles & Koopman 2007). Les ovocytes I s'entourent de cellules somatiques qui s'agrègent en formant des cordons ovariens en contact avec l'épithélium. Au moment de la folliculogénèse, les cordons ovariens se fragmentent pour permettre à chaque ovocyte I de s'entourer d'une couche de cellules folliculaires formant le follicule primordial.

Chez certaines espèces, mais pas la souris, se met en place une stéroïdogénèse transitoire au cours de laquelle la gonade femelle produit des oestrogènes. Chez les femelles, l'absence de production de l'hormone anti-müllérienne (AMH) permet le maintien des canaux de Müller et l'absence de synthèse de testostérone provoque la régression des canaux de Wolff. A partir des canaux de Müller vont se former le pavillon, les oviductes, les trompes de Fallope,



Figure II-3. Coupe histologique du testicule juvénile de *Pleurodeles waltl*. Coloration hématoxyline – éosine. c – cyste (un lobe contient les spermatocytes en différenciation) ; s – spermatocyte; cs – cellule somatique.

l'utérus et une partie du vagin.

II.2 Différenciation testiculaire

Dans la différenciation testiculaire, chez les amphibiens, les cordons médullaires restent massifs, le cortex se réduit et forme l'albuginée qui couvrira la partie médullaire. Les cellules germinales primordiales colonisent les cordons médullaires. Le testicule présente des lobes au sein desquels les spermatogonies sont logées dans des cystes (Fig. II-3). Après la métamorphose, la spermatogenèse se déroulera de façon synchrone dans un cyste. Les spermatozoïdes seront évacués après rupture de la paroi des cystes par les canaux efférents du testicule connectés au canal de Wolff. Celui-ci constitue chez les mâles un urospermiducte. Il est à noter que chez les urodèles le canal de Müller persiste chez les mâles.

Chez les mammifères, suite à la différenciation des cellules de Sertoli, deux compartiments testiculaires se forment : 1) les cordons séminifères, qui contiennent les cellules germinales et les cellules de Sertoli entourées par les cellules myoïdes pérítubulaires ; 2) la région interstitielle qui comprend les précurseurs des cellules de Leydig (futurs cellules stéroïdogènes), des vaisseaux sanguins dont un vaisseau coelomique à la surface de l'organe et des fibroblastes.

Lorsque les cellules germinales atteignent la crête génitale, elles arrêtent de se diviser et rentrent en phase de quiescence (G_0). Après la naissance ces cellules germinales, appelées spermatogonies, reprennent le cycle cellulaire et entrent en méiose, pour être bloquées en phase I de méiose (spermatocytes I). A la puberté, elles reprendront la méiose et subiront de nombreuses modifications pour devenir des spermatozoïdes matures.

Une fois formées, les cellules de Leydig produisent de la testostérone, responsable du développement du tractus génital interne. A partir des canaux de Wolff vont se former les canaux efférents, les vésicules séminales, les canaux déférents et les épидидymes. Les cellules de Leydig produisent également l'hormone Ins13 (insulin-like 3, Ins13), qui est essentielle pour

la migration des testicules jusqu'au scrotum (Nef & Parada 2000). L'AMH secrétée par les cellules de Sertoli est responsable de la régression des canaux de Müller chez les mâles (Brennan & Capel 2004).

II.3 Les acteurs de la différenciation des gonades

De nombreux gènes conservés sont impliqués dans la différenciation des gonades. Certains gènes ont une expression mâle spécifique, comme Sox9 (SRY box 9), Sf1 (Steroidogenic factor 1), AMH et Dmrt1 (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1) ; tandis que les autres montrent plutôt une expression femelle spécifique, par exemple Rspo1 (R-spondin 1), Wnt4 (Wingless-type MMTV and integration site family, member 4), Dax1 (DSS-AHC critical region on the X gene 1, Dax1 ; DSS : dosage sensitive sex reversal ; AHC : adrenal hypoplasia congenita), Foxl2 (Forkhead domain box L2) ou encore la follistatine.

Chez l'homme le gène Sox9, porté par le chromosome 17, est impliqué dans le syndrome de la dysplasie campomélique, dans lequel des malformations du cartilage s'accompagnent de dysgenèse gonadique chez les individus XY (Wagner *et al.* 1994; Foster *et al.* 1994). Chez la souris, l'expression de Sox9 dans une gonade XX est suffisante pour induire un développement mâle (Videl *et al.*, 2001). Chez les mammifères, Sox9 semble être une cible directe de Sry (Sekido & Lovell-Badge 2008). Une expression mâle spécifique de la prostaglandine D synthétase est détectée dans les gonades embryonnaires. La prostaglandine D2 induit la phosphorylation et la translocation nucléaire de SOX9, qui induit la différenciation des cellules de Sertoli (Malki *et al.* 2005). Chez la souris, Sox9 a été identifié comme un marqueur précoce de la différenciation des cellules de Sertoli (Dupont *et al.* 2003). Sox9 est aussi exprimé de façon mâle-spécifique pendant la période de détermination sexuelle chez le poulet, la tortue, l'alligator (Kent *et al.* 1996; Morais da Silva *et al.* 1996; Oreal *et al.* 1998; Smith *et al.* 1999; Western *et al.* 1999a; Western *et al.* 1999b; Oreal *et al.* 2002; Torres Maldonado *et al.* 2002). Chez plusieurs poissons, le poisson zèbre, le fugu et le medaka, deux

gènes Sox9 ont été identifiés (Chiang *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2003; Koopman *et al.* 2004; Kluver *et al.* 2005). Chez le tilapia *Oreochromis niloticus*, Sox9 et AMH ont une expression tardive mais testicule-spécifique (Ijiri *et al.* 2008).

Le gène Sf1 code un récepteur nucléaire orphelin. Chez la souris il est exprimé très tôt lors du développement et permet la mise en place des crêtes génitales (Ikeda *et al.* 1994). Suivant les cas, Sf1 est exprimé plus fortement au cours du développement ovarien comme par exemple chez le poulet, chez l'alligator ou chez la grenouille *Rana catesbeiana* (Mayer *et al.* 2002) ou plus fortement au cours du développement testiculaire comme chez la souris ou la tortue (Ikeda *et al.* 1994; Wibbels *et al.* 1998). La protéine SF1 est un récepteur nucléaire orphelin, qui est capable de se fixer sur le promoteur du gène de l'AMH en présence de SOX9 et d'activer sa transcription dans les cellules de Sertoli (Shen *et al.* 1994). Il régule la synthèse des récepteurs de l'AMH et l'expression des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, comme l'aromatase, enzyme qui catalyse la transformation des androgènes en oestrogènes (Lynch *et al.* 1993; Michael *et al.* 1995; Parker & Schimmer 2002; Akatsuka *et al.* 2005; Gardner *et al.* 2005).

L'hormone AMH induit la régression du canal de Müller dans un développement mâle. Elle se lie sur des récepteurs membranaires à la surface des cellules mésenchymateuses entourant le canal. L'AMH peut aussi bloquer la différenciation des cellules interstitielles de manière paracrine dans les gonades adultes et altérer certains processus de la stéroïdogénèse (Ingraham *et al.* 2000). Le gène de l'AMH a été cloné dans tous les groupes de vertébrés à l'exception des amphibiens. L'AMH a vraisemblablement un rôle important dans la différenciation gonadique dans les groupes où le canal de Müller n'existe pas (téléostéens) ou persiste chez les mâles (amphibiens). Dans la plupart des espèces, son expression est limitée aux cellules de Sertoli dans le testicule et aux cellules de la granulosa ovarienne. Chez la tortue *Trachemys scripta*, où le sexe est déterminé par la température, l'expression de Sox9 apparaît spécifique des cellules de Sertoli présomptives avant la période thermosensible alors que l'AMH est exprimée chez les mâles après cette période (Shoemaker *et al.* 2007a). Ces

résultats suggèrent que l'expression de l'AMH chez les reptiles peut aussi être directement régulée par Sox9 comme chez les mammifères.

Le gène *Dmrt1* est homologue du gène *mab3* de *Caenorhabditis elegans* et du gène doublesex de *Drosophila melanogaster*. C'est un gène très conservé dans toutes les classes de vertébrés, qui s'exprime dans les crêtes génitales et au niveau des testicules adultes (Raymond *et al.* 1999; Matsuda *et al.* 2007; Ijiri *et al.* 2008; Yoshimoto *et al.* 2008).

D'autres gènes comme *Rspo1*, *Wnt4*, *Dax1* et *Foxl2* sont décrits comme spécifiques d'un développement ovarien chez plusieurs vertébrés (Smith *et al.* 1999; Western *et al.* 1999b; Torres Maldonado *et al.* 2002; Loffler *et al.* 2003; Parma *et al.* 2006).

Wnt4 appartient à la famille WNT, famille de glycoprotéines riches en cystéines. Il s'agit de facteurs de signalisation extracellulaires impliqués dans divers processus de développement (Cadigan & Nusse 1997). Chez les mammifères, *Wnt4* est essentiel au développement du rein, du tractus génital féminin et à la différenciation de l'ovaire (Stark *et al.* 1994). *Wnt4* est exprimé dans les ovaires, et une expression intense est détectée dans les canaux de Müller mais absente dans les canaux de Wolff (Vainio *et al.* 1999). Les souris *Wnt4*^{-/-} meurent peu après la naissance d'insuffisance rénale aiguë, et les gonades XX sont partiellement masculinisées (Vainio *et al.* 1999). Néanmoins chez la grenouille *Rana rugosa* comme chez la tortue *Trachemys scripta*, *Wnt4* ne montre pas d'expression sexuellement dimorphique dans les gonades (Oshima *et al.* 2005; Shoemaker *et al.* 2007b).

Le gène *Dax1*, porté par le chromosome X (Xp21), a été découvert pour son implication dans le syndrome d'hypoplasie congénitale des surrénales associée à un hypogonadisme chez l'homme (Muscatelli *et al.* 1994) ; une duplication de *Dax1* entraîne les individus XY à se développer en femelle (Bardoni *et al.* 1994). Le rôle de *Dax1* est encore peu connu. Chez les mammifères, l'expression de l'AMH est négativement régulée par *Dax1* et *Fog2* (Feminization of Germline, *Fog2*) dans les cellules de la granulosa (Lasala *et al.* 2004). Chez le poulet, l'expression de *Dax1* est spécifique des femelles dans les gonades embryonnaires (Yamamoto *et al.* 2003). Chez la tortue *Lepidochelys olivacea*, l'expression de *Dax1* ne

montre pas de différence entre mâle et femelle pendant la période thermosensible, mais elle augmente dans les ovaires une fois que les gonades deviennent histologiquement distinguables (Torres Maldonado *et al.* 2002). Chez le medaka *Oryzias latipes*, Dax1 est seulement exprimé dans les follicules post-vitellogéniques, et il pourrait réguler l'expression de Sf1 et de l'aromatase (Nakamoto *et al.* 2007). Chez cette même espèce, l'expression des enzymes P450c17s pourrait aussi être régulée par Dax1 avec la participation de Sf1, Lrh1 (human liver-receptor homologue 1) et de Foxl2 (Zhou *et al.* 2007).

Foxl2 est une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription à domaine *forkhead*. Chez l'homme, la mutation de ce gène est responsable d'un syndrome de malformation des paupières, associant dans un dysfonctionnement ovarien (Crisponi *et al.* 2001; Bell *et al.* 2001 ; Prueitt & Zinn 2001). Chez la chèvre, Foxl2 active l'expression de l'aromatase en se liant directement sur le promoteur 2 (Pannetier *et al.* 2006), chez la souris Foxl2 est essentiel pour le maintien de la fonction ovarienne (Ottolenghi *et al.* 2005). Foxl2 est conservé au cours de l'évolution des vertébrés (Loffler *et al.* 2003). Chez le poulet, une expression intense de Foxl2 est détectée dans les ovocytes matures et ovulaires et dans les cellules folliculaires (Govoroun *et al.* 2004). Par contre chez le poisson medaka, l'expression de Foxl2 est détectée exclusivement dans les cellules de la granulosa et les cellules folliculaires, ce qui montre son implication dans la différenciation des cellules de la granulosa (Nakamoto *et al.* 2006). Chez le tilapia, l'expression de Foxl2 et de l'aromatase est spécifique des gonades femelles (Ijiri *et al.* 2008), l'expression de l'aromatase est régulée par Foxl2 comme chez la chèvre (Wang *et al.* 2007).

Chez les amphibiens, ces gènes impliqués dans la différenciation sexuelle sont conservés, mais leur rôle dans le développement des gonades ne sont pas identifiés.

Au contraire des mammifères et des oiseaux, l'expression de Sox9 chez *Rana rugosa* ne montre pas de dimorphisme sexuel (Takase *et al.* 2000). Le gène Dmrt1 a été cloné et analysé chez *Xenopus laevis* et *Rana rugosa*, et comme chez les autres vertébrés, il semble avoir une importance dans la différenciation testiculaire (Shibata *et al.* 2002; Aoyama *et al.* 2003;

Osawa *et al.* 2005). Chez *Pleurodeles waltl* comme chez le poulet, l'alligator et *R. catesbeiana*, Sfl montre une expression plus forte dans les gonades femelles mais cette expression n'intervient probablement pas dans l'inversion sexuelle femelle *versus* mâle induite par la température (Kuntz *et al.* 2006). Le gène Wnt4 chez *R. rugosa* semble jouer un rôle dans le développement gonadique sans montrer de différence d'expression entre les sexes (Oshima *et al.* 2005).

III.

Implications des stéroïdes et de leur récepteurs dans la différenciation du sexe

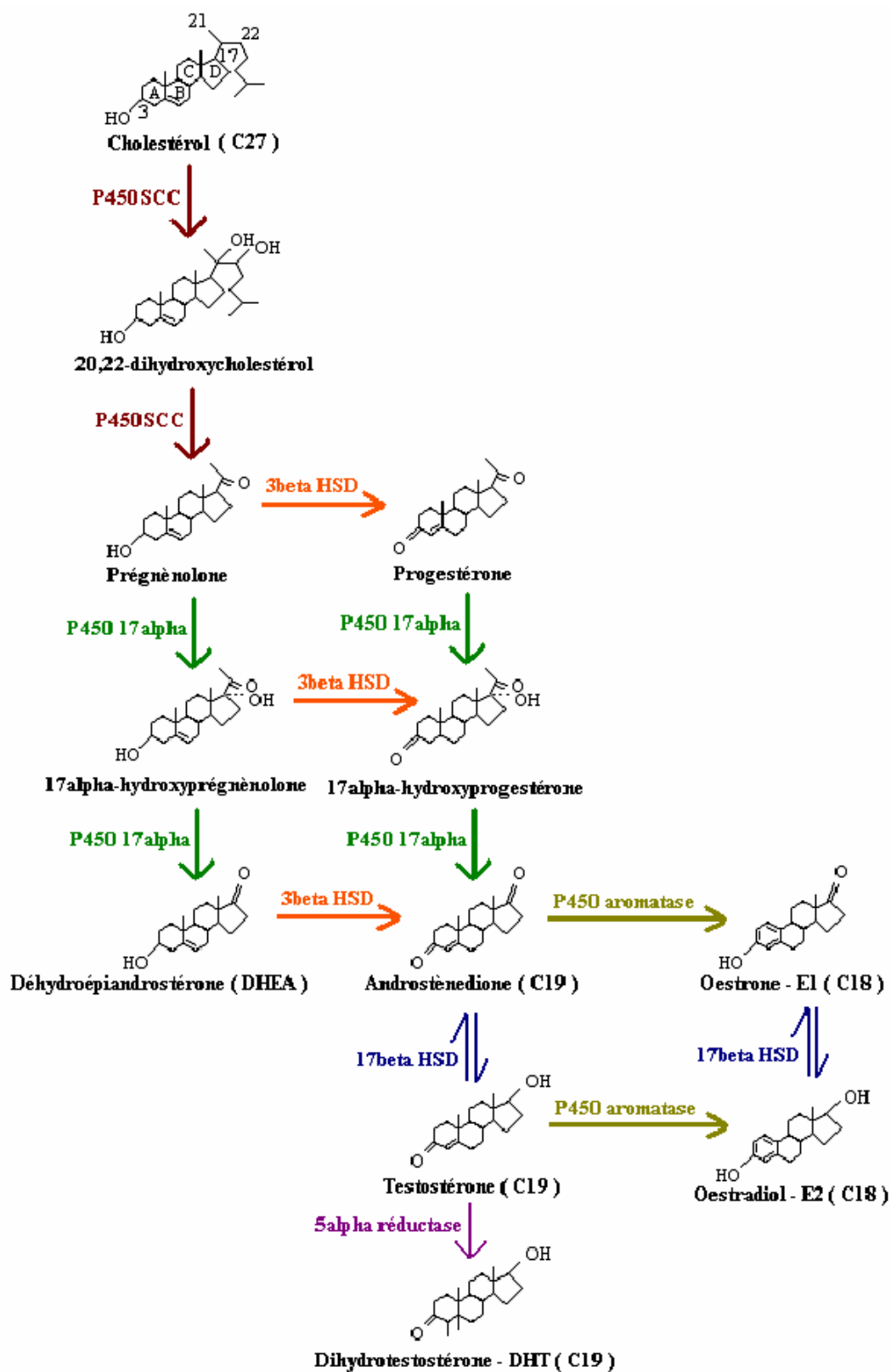


Figure III-1. Etapes principales de la production des hormones sexuelles chez les mammifères.

III. Implications des stéroïdes dans la différenciation du sexe

Chez les vertébrés non mammifères, les hormones stéroïdiennes jouent un rôle primordial dans la mise en place des gonades. De nombreuses inversions sexuelles par des traitements hormonaux ont été rapportées chez différentes espèces. Ceci montre la plasticité de la mise en place des gonades en aval de l'étape de détermination chez ces vertébrés.

III.1 Hormones stéroïdiennes

III.1.1 Stéroïdogénèse (Fig. III-1) (Miller 1988)

Les hormones stéroïdes sont synthétisées à partir du cholestérol à l'issue de plusieurs réactions enzymatiques. Le cholestérol est synthétisé dans les cellules stéroïdogènes à partir de l'acétyl-CoA et du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) par l'enzyme HMG-CoA réductase. Le cholestérol peut aussi être importé dans les cellules.

L'étape clé et limitante de la biosynthèse des stéroïdes sexuels est la coupure de la chaîne latérale du cholestérol. Le cholestérol est transformé successivement en 20,22-dihydroxycholestérol et prégnénolone, par l'enzyme cytochrome P450_{scc} (side chain clivage, SCC) présent dans la membrane mitochondriale.

Au niveau du réticulum endoplasmique, prégnénolone et progestérone sont converties en androstènedione, précurseur des androgènes qui possèdent 19 atomes de carbone, par l'action de la 17 α -hydroxylase. Sous l'action de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β HSD) et de la 5 α -réductase, l'androstènedione est convertie successivement en testostérone et dihydrotestostérone (DHT) androgènes majeurs intervenant dans la différenciation du sexe mâle. Il faut préciser que la DHT est non-aromatisable.

Les oestrogènes résultent de l'aromatation des androgènes par l'enzyme cytochrome P450 aromatasase présente dans le réticulum endoplasmique. Ces oestrogènes, oestrone et

oestradiol, possèdent 18 atomes de carbone et jouent un rôle important dans la différenciation du sexe femelle. Ils sont produits dans les cellules des follicules ovariens (cellules de la thèque interne et cellules de la granulosa), tandis que les androgènes sont synthétisés dans les cellules de Leydig testiculaire. Chez *Rana rugosa*, l'expression de l'aromatase se situe dans les cellules somatiques (équivalentes des cellules folliculaires chez les mammifères) qui entourent les ovocytes (Kato *et al.* 2004b).

III.1.2 Stéroïdes et différenciation gonadique

III.1.2a Oestrogènes

Chez de nombreuses espèces, il existe une bonne corrélation entre l'expression des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse des oestrogènes et la différenciation ovarienne. La majorité des études ont porté sur l'aromatase. Cette enzyme est exprimée de façon tissu spécifique par le biais de différents promoteurs. Une expression gonadique plus forte est observée lors de la différenciation ovarienne chez les amphibiens, tant chez les anoures que chez les urodèles (Kuntz *et al.* 2003b; Urbatzka *et al.* 2007). La même corrélation a été rapportée chez le poulet (Elbrecht & Smith 1992). La situation est identique chez les poissons (Guiguen *et al.* 1999). Chez les reptiles, le niveau d'expression de l'aromatase est plus élevée pendant la période thermo-sensible lorsque l'incubation des oeufs s'effectue à température féminisante (Crews *et al.* 2001). Il est cependant à noter l'existence chez de nombreux téléostéens de deux gènes codant l'aromatase, l'un étant exprimé dans les gonades, l'autre dans le cerveau (Chang *et al.* 2005; Matsuoka *et al.* 2006; van & Andersen 2006). Dans ce cas le gène Cyp19a est exprimé préférentiellement dans les gonades et son expression augmente lors de la différenciation ovarienne (Matsuoka *et al.* 2006).

Ces résultats relatifs aux taux d'ARNm sont cohérents avec les mesures d'activité enzymatique réalisés dans ces divers modèles animaux (Desvages & Pieau 1992; Chardard *et*

al. 1995; Vaillant *et al.* 2001; Pieau & Dorizzi 2004).

Les dosages d'oestrogènes chez les embryons ou les larves au cours de la différenciation sexuelle n'ont pu être réalisés que dans un faible nombre d'espèces du fait de la petite taille des individus au moment des analyses. Tous ces résultats suggèrent un rôle clé des oestrogènes dans la différenciation ovarienne. Ce rôle a pu être démontré grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de l'aromatase. Dans différents groupes de vertébrés non mammifères, ces composés ont induit des inversions sexuelles (Chardard & Dournon 1999; Bergeron *et al.* 1999; Miyata & Kubo 2000; Ohtani *et al.* 2003).

De même, les traitements réalisés avec des oestrogènes aboutissent à des inversions sexuelles qui peuvent être déterminées soit par l'analyse de la sexe-ratio, soit par l'analyse du génotype des individus lorsque cela est possible (Gallien 1951; Crews *et al.* 1991; Kloas *et al.* 1999; Bergeron *et al.* 1999; Kuntz *et al.* 2003a).

Enfin dans les situations où la température d'élevage est capable de masculiniser les individus, on observe une chute de l'activité de l'aromatase (Chardard *et al.* 1995).

Chez les mammifères, les oestrogènes interviennent notamment dans les cycles ovariens mais aussi dans la spermatogenèse des individus mâles. Les oestrogènes sont synthétisés par les cellules de la granulosa, où l'expression de l'aromatase est contrôlée par des gonadotropines hypophysaires : LH (luteinizing hormone) et FSH (follicle-stimulating hormone) (Fitzpatrick & Richards 1991). Cette expression est aussi corrélée avec le phénomène d'ovulation (Hinshelwood *et al.* 1997). Une concentration normale d'oestrogènes circulants est importante pour un bon fonctionnement du cycle ovarien (Laven & Fauser 2006). Les oestrogènes interviennent aussi dans la reproduction mâle, surtout dans l'achèvement de la spermatogenèse (Lambard & Carreau 2005; Carreau *et al.* 2006). Chez l'homme, les oestrogènes interviennent dans l'acquisition de la mobilité des spermatozoïdes (Rochira *et al.* 2005).

III.1.2b Androgènes

Les principales enzymes intervenant dans la production des androgènes comme la 5 α -réductase et les 3 β HSD, sont moins étudiés par rapport au rôle de l'aromatase. Chez *Xenopus laevis*, le messenger de la 5 α -réductase est principalement exprimé dans les futurs testicules (Urbatzka *et al.* 2007); cependant chez *Rana rugosa*, l'expression de la 5 α -réductase ne montre pas de différence entre les sexes (Maruo *et al.* 2008). De même, chez le poulet, l'expression de la 3 β HSD ne montre pas de différence entre mâles et femelles pendant la différenciation gonadique (Nomura *et al.* 1999).

Chez le poulet, la concentration plasmatique de la testostérone peut prédire le sexe mâle différencié (Vaillant *et al.* 2003). De même une administration d'androgènes peut inverser le sexe chez certains vertébrés. Un traitement par des androgènes entraîne une masculinisation chez certains poissons et amphibiens (Bogi *et al.* 2002; Chardard *et al.* 2003; Ogino *et al.* 2004). Chez certains amphibiens urodèles comme le pleurodèle, la testostérone n'affecte pas les larves femelles mais elle provoque l'inversion sexuelle des mâles en femelles. Cet effet a été dénommé effet paradoxal. Chez *Trachemys scripta*, une tortue chez laquelle la température détermine la différenciation du sexe, la testostérone n'a pas d'effet à température féminisante, mais elle entraîne la production de femelles à température masculinisante (Bergeron *et al.* 1999). Chez cette même espèce, si l'on administre de la DHT au lieu de la testostérone à température masculinisante, on obtient 100% d'individus mâles, et la proportion des mâles est augmentée à température intermédiaire (Crews & Bergeron 1994). Cet androgène non aromatisable n'entraîne pas non plus d'effet paradoxal et inverse les larves femelles de pleurodèle (Chardard *et al.* 2003). L'effet paradoxal s'expliquerait donc par la conversion de la testostérone en oestradiol par l'aromatase.

Chez les mammifères, la présence de testostérone, produite par les cellules de Leydig, est essentielle pour le maintien des canaux de Wolff, et leur différenciation en épидидyme, canal déférent et vésicule séminale (Nef & Parada 2000). La testostérone est convertie en DHT dans

les tissus périphériques, cet androgène assure notamment la différenciation des organes génitaux mâles.

III.1.2c Stéroïdes extragonadiques

Les stéroïdes sexuels peuvent être produits aussi dans des tissus extra-gonadiques : le foie, la peau, la prostate et le système nerveux central pour les androgènes d'une part, le tissu adipeux et le système nerveux central pour les oestrogènes d'autre part. Les stéroïdes sexuels extra-gonadiques pourraient intervenir dans la différenciation sexuelle et le développement des caractères sexuels secondaires.

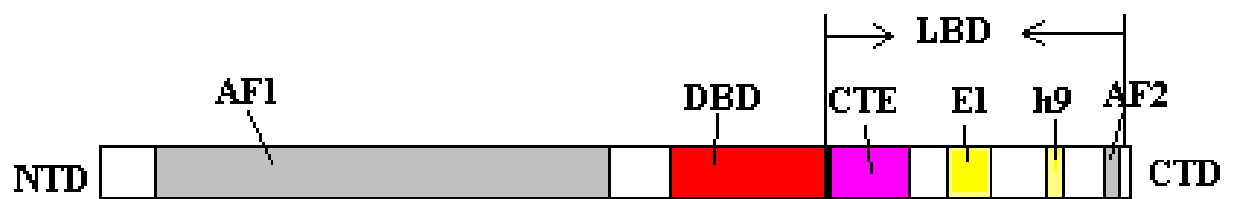
L'implication des stéroïdes cérébraux dans la différenciation gonadique est bien étudiée, et l'enzyme la plus analysée est l'aromatase. Chez les poissons, deux types d'aromatase existent : aromatase gonadique (aromG, codé par le gène CYP19a) et aromatase cérébrale (aromB, codé par gène CYP19b) (Trant *et al.* 2001; Matsuoka *et al.* 2006). Chez le poisson *Hippoglossus hippoglossus*, l'expression hypophysaire d'aromB a lieu avant celle d'aromG, et toutes les deux apparaissent avant la différenciation gonadique (Matsuoka *et al.* 2006). De même, chez l'alligator comme chez le poisson *Acanthopagrus schlegeli*, l'activité de l'aromatase dans le cerveau apparaît avant celle des gonades, ce qui suggère un rôle possible des stéroïdes cérébraux dans le déclenchement de la différenciation gonadique (Milnes, Jr. *et al.* 2002; Tomy *et al.* 2007). En effet, de nombreux poissons hermaphrodites changent de sexe en fonction de stimuli sociaux : chez le poisson *Thalassoma bifasciatum*, les oestrogènes changeraient le sexe gonadique en répondant à l'environnement social *via* la voie de signalisation de la dopamine (Marsh *et al.* 2006).

III.1.3 Stéroïdes et différenciation du tractus génital

Chez les vertébrés, un système embryonnaire de double canaux : canal de Müller et canal

de Wolff, existe. Après la formation des gonades, l'AMH sécrétée par les cellules de Sertoli entraîne la régression des canaux de Müller chez les individus mâles, et la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig assure le développement du tractus génital mâle à partir des canaux de Wolff. Chez les individus femelles, à défaut d'AMH et de testostérone, les canaux de Müller persistent et se développent en formant le tractus génital femelle. Il est à noter que chez les femelles, le développement du tractus génital est dépendant des oestrogènes chez les vertébrés ovipares.

Bien que le rôle de l'AMH soit plus ou moins identifié chez différentes espèces, le rôle des stéroïdes sexuels dans la différenciation des tractus génitaux reste à illustrer. La plupart des études se sont concentrées sur l'effet féminisant et le mécanisme d'action de l'oestradiol. Chez la tortue *Trachemys scripta*, l'administration d'oestradiol à une température féminisante avant la différenciation gonadique bloque le développement des canaux de Müller ; tandis qu'une administration après le début de la différenciation gonadique entraîne une hypertrophie des canaux de Müller et empêche un développement de ces canaux vers l'extrémité caudale (Dodd & Wibbels 2008). Chez *Alligator mississippiensis*, l'oestradiol prévient la régression des canaux de Müller induite par une greffe de testicule chez les femelles castrées (Austin 1989). Chez le poulet, la greffe testiculaire dans un embryon femelle entraîne la régression des canaux de Müller. Cette régression est bloquée quand le greffon est traité à l'oestradiol ; tandis que la régression persiste lorsque le greffon est traité à l'oestradiol et au tamoxifen (Stoll *et al.* 1993). Chez la salamandre *Ambystoma ambystoma*, l'oestradiol et la DHT stimulent la prolifération cellulaire et l'hypertrophie des canaux de Müller ; tandis qu'une prolifération cellulaire des canaux de Wolff est seulement stimulée par la DHT (Clark *et al.* 1998).



(D'après Whitfield et al., 1999)

Figure III-2. Structure générale d'un récepteur nucléaire. NTD – N-terminal domaine, AF1 – transactivation domaine 1, DBD – DNA binding domaine, LBD – ligand binding domaine, CTE – C-terminal extension, CTD – C-terminal domaine.

III.2 Récepteurs des hormones stéroïdiennes

III.2.1 Description des récepteurs stéroïdiens

III.2.1a Structure

Les récepteurs stéroïdiens appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui sont des facteurs de transcription activés par des ligands. Tous ces récepteurs ont des organisations structurales similaires, leurs ligands ayant aussi des masses moléculaires similaires (Whitfield *et al.* 1999).

Au niveau protéique, un récepteur nucléaire se compose généralement de six domaines principaux nommés de A à F. Le domaine A/B correspond à la région N-terminale du récepteur. Un domaine central de liaison à l'ADN constitue le domaine C. Une région charnière peu conservée entre les espèces est le domaine D. Un domaine de liaison aux ligands est représenté par le domaine E et le domaine F. Il constitue la région C-terminale de la protéine.

Au sein de cette structure commune aux récepteurs nucléaires, de nombreux domaines fonctionnels existent :

- les domaines de transactivation AF1 et AF2 qui se situent dans le domaine A/B et le domaine E/F (Fig. III-2).

- un domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain - DBD). Il est très conservé au cours de l'évolution. Il est souvent composé de deux doigts de zinc de type C4. L'affinité de la liaison à la séquence d'ADN est renforcée par les acides aminés basiques du domaine suivant.

- C-Terminal Extension (CTE). C'est une région variable entre les récepteurs. La longueur et la participation de ce domaine dans la liaison à l'ADN dépendent de l'écart entre les deux éléments de réponse répétés sur la séquence d'ADN.

- un Ligand Binding Domain (LBD). Ce domaine partage une structure tridimensionnelle similaire pour tous les récepteurs nucléaires en raison de la similarité de positionnement des ligands. La spécificité entre le ligand et son récepteur est assurée par la présence d'une chaîne d'acides aminés unique qui construit la poche de liaison.

- deux domaines impliqués dans la dimérisation : E1 domaine très conservé, riche en résidus Lysine et h9 (hepted nine), lui aussi très conservé, souvent constitué de trois résidus hydrophobes séparés par trois ou quatre acides aminés.

Les récepteurs nucléaires sont divisés en six sous familles, les récepteurs stéroïdiens correspondent à la sous famille NR3.

III.2.1b Mécanisme de fonctionnement

Le fonctionnement des récepteurs nucléaires se décompose en plusieurs étapes (Whitfield *et al.* 1999).

La liaison du ligand induit des changements conformationnels permettant la dimérisation. Celle-ci va augmenter l'affinité du complexe ligand-récepteur envers les éléments de réponse sur l'ADN.

Les récepteurs vont interagir avec d'autres protéines. Ce sont des protéines corégulatrices pour la transcription. Par exemple des protéines histone acétyl transferase (HAT) vont acétyler les histones présentes au niveau de la région promotrice du gène cible, et vont ainsi permettre l'accès du complexe ligand-récepteur. Puis le remodelage de la chromatine et la transcription se font aussi en plusieurs étapes, chacune nécessitant un ou plusieurs facteurs spécifiques. La spécificité des protéines recrutées dépend du type cellulaire et du récepteur.

Une fois fixé sur les éléments de réponse et le complexe de préinitiation formé, la transcription du gène cible pourra avoir lieu. Ce mode de fonctionnement correspond à la voie classique d'activation des récepteurs nucléaires mais il faut savoir que ces récepteurs peuvent

aussi fonctionner de façon différente. Des activations ligand-indépendantes ont par exemple été décrites.

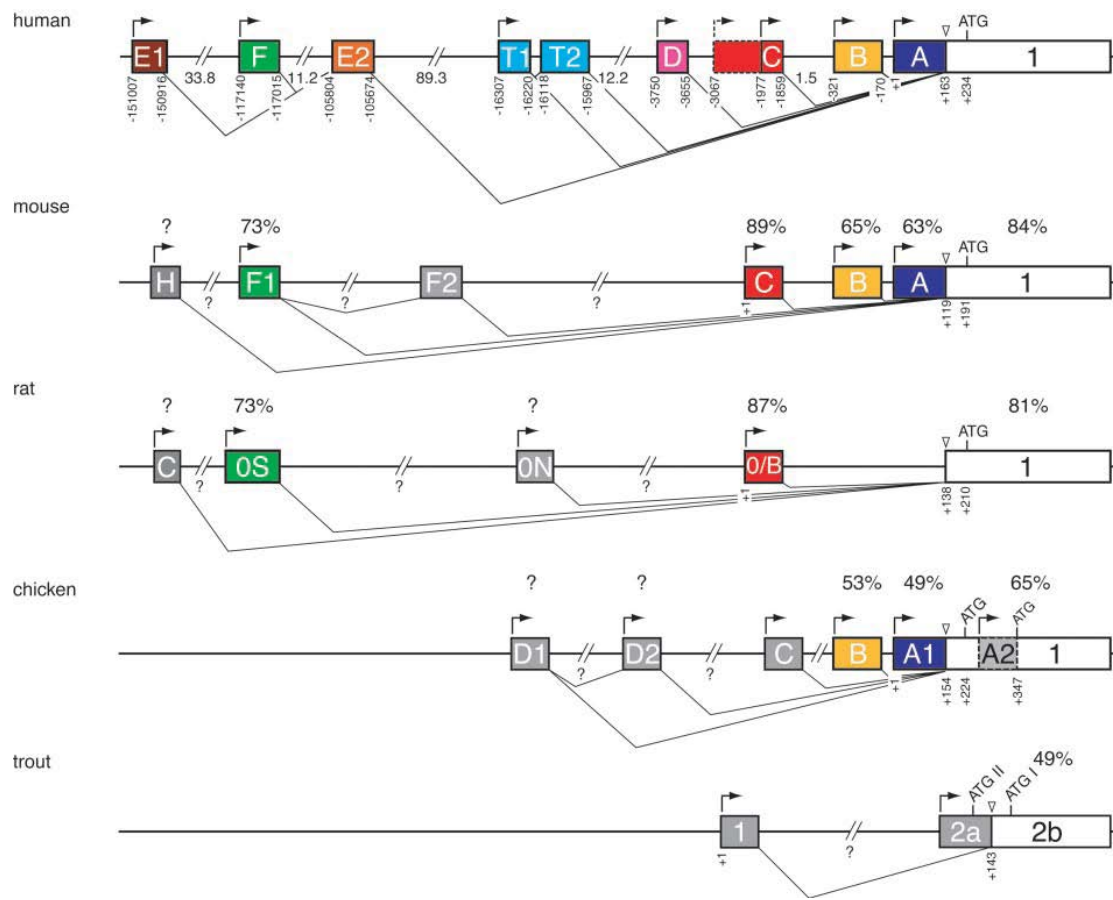
III.2.2 Récepteurs des oestrogènes (ERs)

III.2.2a Les différentes isoformes

Deux types d'ER, α et β , ont été identifiés chez différentes classes de vertébrés : les amphibiens (Wu *et al.* 2003), les reptiles (Katsu *et al.* 2004), les oiseaux (Foidart *et al.* 1999; Bernard *et al.* 1999) et les mammifères (Kuiper *et al.* 1997). Chez les téléostéens, trois types d'ER ont été identifiés : α , β et γ (Hawkins *et al.* 2000; Menuet *et al.* 2002; Sabo-Attwood *et al.* 2004; Halm *et al.* 2004; Filby & Tyler 2005). L'ER γ qui est similaire à l'ER β , pourrait être le résultat d'une duplication génique. Les différents types d'ER possèdent des structures très similaires, notamment au niveau des domaines de liaison à l'ADN et aux ligands. Les isoformes α et β ont été les plus étudiées, en particulier chez les mammifères.

Chez l'homme, ER α et ER β (aussi appelés NR3A1 et NR3A2) sont les produits de 2 gènes différents (ESR1 et ESR2) présents sur 2 chromosomes distincts (loci 6q25.1 et 14q23.2). ESR1 et ESR2 comportent 8 exons séparés par 7 régions introniques. La plupart des ARNm codant ER α diffèrent par leur extrémité 5'UTR mais résultent en l'expression d'une protéine de 66kDa. Des variants d'épissage sont décrits. Les plus fréquents constituent des messagers dont les exons 3 et/ou 4 sont absents. La traduction de ces messagers n'est pas certaine. Une protéine ER α plus courte de 46kDa a toutefois été mise en évidence (Flouriot *et al.* 2000). Elle serait produite à partir d'un codon start interne et serait dépourvue de l'exon 1 et par conséquent de la région AF1. Cette forme est exprimée dans les ostéoblastes et dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7.

La première forme d'ER β décrite possédait 485 acides aminés (Mosselman *et al.* 1996). Cependant un clonage d'une extension N-terminale a permis de découvrir une forme plus



(D'après Kos et al., 2001)

Figure III-3. Comparaison des régions promotrices de gènes ER α de différentes espèces. Les rectangles colorés représentent les différents exons selon la nomenclature actuelle. Les nombres situés en dessous des exons indiquent leur distance par rapport au premier site de début de la transcription (+1). Les nombres situés entre les exons indiquent la taille des introns en kilo paires de bases. Le site commun accepteur d'épissage est indiqué par un triangle. Les exons conservés entre l'Homme et les autres espèces sont marqués du même couleur, et leur pourcentage d'identité par rapport à la séquence humaine sont décrits dessus. Les exons, qui n'ont pas de séquences comparatives chez l'Homme, sont marqués en gris pâle. Les exons conservés entre les espèces mais qui sont pas connus chez l'Homme sont marqués en gris foncé.

longue comportant 530 acides aminés. Ces deux formes sont dénommées ERβ1 court et ERβ1 longue respectivement. Des variants dépourvus de l'exon 5 et/ou de l'exon 6 ont été décrits dans de nombreuses lignées cancéreuses (Vladusic *et al.* 1998). L'absence de l'exon 5 aboutit à la traduction d'une protéine tronquée dépourvue de la majorité du LBD. La coexpression de cette forme avec ERα ou ERβ1 inhibe la transcription E₂-dépendante contrôlée par un ERE. Il pourrait s'agir en quelque sorte d'un inhibiteur d'ER. Une autre isoforme ERβ2 aussi appelée ERβcx a été décrite (Enmark *et al.* 1997). Elle est identique à ERβ1 longue, à part le remplacement de l'exon 8 par un exon 9 codant 26 acides aminés. Cette forme de 485 acides aminés ne fixe pas de ligand et n'active pas la transcription d'un gène rapporteur sensible aux oestrogènes. ERβ2 s'hétérodimérise préférentiellement avec ERα plutôt qu'avec ERβ. Cela inhibe la liaison de l'ERα à l'ADN et ERβ2 se comporte donc comme un dominant négatif pour ERα. ERα comporte deux domaines de transactivation : AF1 et AF2, tandis que ERβ possède seulement le domaine AF2 et un autre domaine répresseur (Hall & McDonnell 1999).

III.2.2b Régulation de l'expression d'ERs

Sept promoteurs ont été identifiés chez l'homme pour le gène codant ERα : A, B, C, D, E, F et T (Fig. III-3). L'utilisation de ces différents promoteurs et le choix de l'exon 1 sont tissus spécifiques. Chez les autres espèces où la région promotrice d'ERα est identifiée, différentes zones promotrices et exons 1 ont aussi été découverts (Fig. III-3). Ces promoteurs et exons sont plus ou moins conservés par rapport aux séquences humaines, mais présentent différents réarrangements dans l'ensemble de la structure génomique (Flouriot *et al.* 1998; Kos *et al.* 2001).

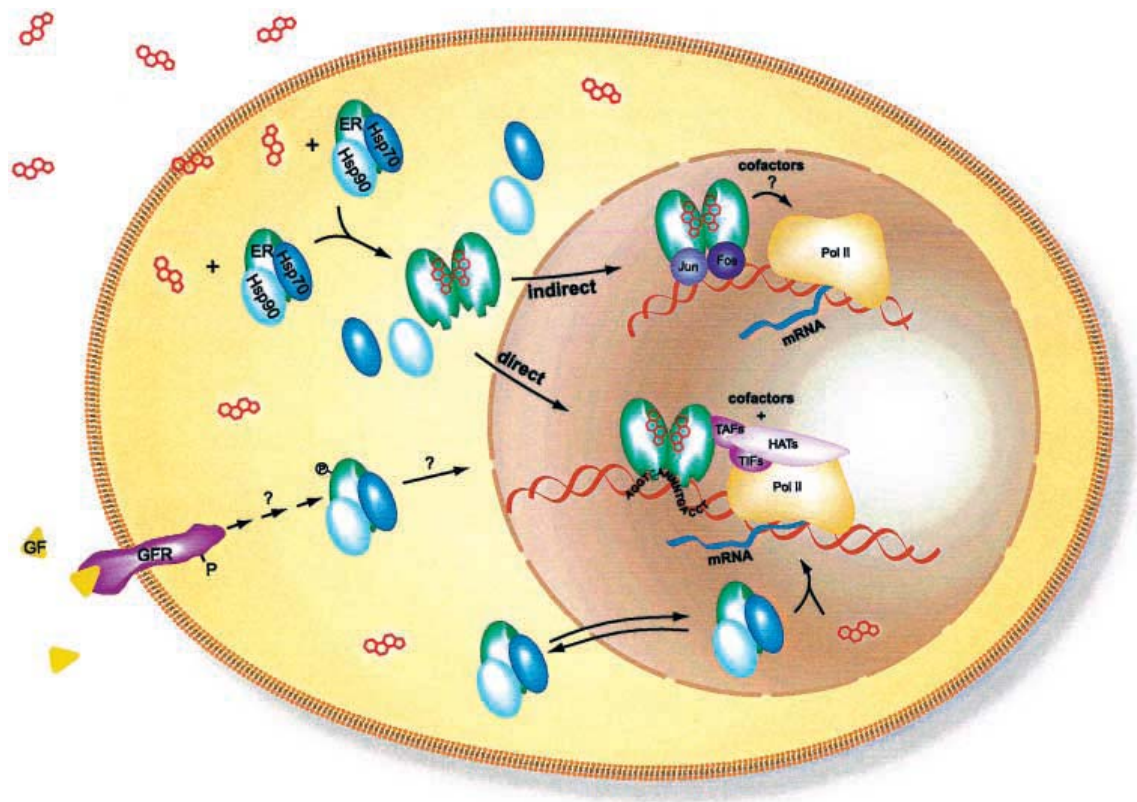
Les promoteurs humains situés à 2kb en amont du site d'épissage commun (promoteurs A, B et C) sont majoritairement utilisés dans les lignées cellulaires et tissus exprimant des taux élevés d'ERα, alors que les promoteurs les plus éloignés (E et F) sont utilisés dans les tissus où l'ERα est peu abondant tels que le foie ou les os (Herynk & Fuqua 2004). Le

promoteur F est le seul promoteur utilisé dans les tissus osseux ; l'activité de ce promoteur pourrait être stimulée par l'oestradiol *via* le complexe ER α /AP1 (Activator protein 1, AP1) (Lambertini *et al.* 2008). Dans le testicule et l'épididyme, l'expression des isoformes d'ER α est contrôlée par le promoteur T, qui est utilisé seulement dans ces deux organes (Brand *et al.* 2002). Chez le poulet, quatre isoformes d'ER α messenger sont issues de l'épissage alternatif et de l'utilisation de différents promoteurs tissu- ou stade de développement spécifiques (Griffin *et al.* 1998). L'épissage alternatif a aussi été décrit chez la truite (Pakdel *et al.* 2000; Menuet *et al.* 2001).

L'expression d'ER α pourrait être aussi régulée par un programme épigénétique d'inhibition par méthylation de l'ADN. Dans les cellules cancéreuses mammaires ER-négatives, MBA-MB-231 et MBA-MB-435, les promoteurs A et B sont méthylés au niveau des îlots CpG (Tang & Jiang 2005). Dans les cellules ovariennes et mammaires, les inhibiteurs de désacétylase zinc-dépendants induisent une réduction du messenger d'ER α et la disparition de la protéine ER α , en recrutant la protéine MeCP2 (méthyl cytosine binding protein 2) (Reid *et al.* 2005). Chez le rat femelle, l'ischémie cérébrale induit un recrutement des protéines MeCP2 sur la région 5' non codante d'ER α et entraîne l'inhibition du gène (Westberry *et al.* 2008; Wilson *et al.* 2008).

Chez la truite, l'expression d'ER est autorégulée *via* le site ERE présent dans la région promotrice (Le *et al.* 1995). Cette autorégulation pourrait aussi être induite par interaction de la protéine COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promoter – transcription factor 1, COUP-TF1) avec l'ER *via* un site ERE imparfait (Petit *et al.* 1999). Chez *X. laevis*, l'autorégulation d'ER est liée au site ERE imparfait situé dans la région 5'UTR (Lee *et al.* 1995).

La régulation de l'expression des ERs peut aussi s'effectuer au niveau de la stabilité de l'ARN messenger et de la protéine. Les 3'UTR d'ER α sont souvent très longues et riches en motif AUUUA, un motif qui réduit la demie-vie de l'ARN messenger (Kenealy *et al.* 2000; Cardazzo *et al.* 2005). Les modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination



(D'après Reid et al., 2002)

Figure III-4. Mécanismes de fonctionnement de l'ER α . ER α peut trans-activer les gènes cibles des oestrogènes de manière directe ou indirecte. Les ER α libres sont associés avec les protéines HSPs sous forme monomérique, et se présentent entre le cytoplasme et le noyau. Une fois que la liaison au ligand a eu lieu, les ER α subissent un changement conformationnel, se dissocient d'avec les HSPs, se dimérisent et transloquent dans le compartiment nucléaire. Les ER α activés par les ligands peuvent activer la transcription des gènes cibles *via* une liaison directe sur le consensus ERE ou *via* une liaison indirecte sur le consensus AP1 avec la participation hétérodimérique des protéines Jun et Fos. Dans les deux cas, les ER α recrutent des co-facteurs, qui à leur tour modifient la structure locale de la chromatine et activent la transcription. Il existe aussi différentes voies de signalisation, qui pourraient activer les fonctions d'ER α . GF – growth factor ; GFR – growth factor receptor ; TAF – transcription activating factor ; TIF – transcription intermediary factor ; HAT – histone acetyl transferase ; PolII – DNA-dependent RNA polymérase II.

constituent un signal de la dégradation des protéines par le protéasome. Pour l'ER α , les résultats montrent que l'ubiquitination affecte non seulement la capacité de la transactivation d'ER α , mais aussi sa capacité de translocation nucléaire (Stenoien *et al.* 2001).

La première caractérisation du promoteur d'ER β identifia une région dénommée exon ON puis une région promotrice située plus en amont fut découverte OK. Depuis le séquençage du génome humain, cinq exons supplémentaires localisés entre les régions OK et ON ont été identifiés. Ces résultats suggèrent une régulation de l'expression d'ER β aussi sophistiquée que celle d'ER α .

Comme pour ER α , les régions promotrices d'ER β sont aussi sujettes à la méthylation. Le promoteur ON en particulier serait méthylé au niveau des îlots CpG dans de nombreuses lignées cellulaires de cancer de prostate et d'échantillons de tissus prostatiques cancéreux (Sasaki *et al.* 2002). Des méthylations des promoteurs ON et OK et la diminution de l'expression d'ER β ont aussi été décrites dans des cellules cancéreuses mammaires humaines (Rody *et al.* 2005).

III.2.2c Spécificité et mécanismes de fonctionnement (Fig. III-4)

En absence de ligands, les ER sont complexés aux protéines HSP70 et HSP90 par une machinerie chaperone complexe qui interagit spécifiquement avec le LBD. Le LBD est la deuxième région la plus conservée entre les différents ER. Il est constitué de trois couches antiparallèles d'hélice α : la couche centrale faite des hélices H5-6, H9 et H10 est prise en sandwich entre deux autres couches comprenant les hélices H1-4, H7, H8 et H11. Cet arrangement aménage une poche pour la fixation du ligand. Les autres éléments du LBD sont un petit feuillet β antiparallèle à deux brins (S1 et S2) et l'hélice α H12 (Ascenzi *et al.* 2006). Les sites de liaison des stéroïdes des récepteurs ER α et ER β sont identiques à l'exception de deux résidus : les Leu³⁸⁴ et Met⁴²¹ de l'ER α correspondant aux résidus Met³³⁶ et Ile³⁷³ de l'ER β . L'hélice C-terminale H12 contient la séquence critique pour la région AF2. Une

conséquence importante de la fixation d'un ligand peut être de modifier la position de l'hélice H12 et de rendre possible (pour les agonistes) ou impossible (pour les antagonistes), une conformation de la région AF2 compétente pour la transcription. Ainsi, en présence d'oestradiol, l'hélice H12 se referme sur la poche de liaison du ligand et constitue une surface d'interaction pour le recrutement de co-activateurs. Par contre, lorsque l'ER α ou l'ER β sont associés à un antagoniste, l'hélice H12 occupe une position différente (la région hydrophobe formée par H3, H4 et H5). Cela ne permet pas la fixation de co-activateurs.

Malgré une homologie importante de lien LBD, ER α et ER β montrent des affinités différentes pour les ligands. L'E₂ se fixe avec une plus grande affinité sur l'ER α que sur l'ER β . Par contre, l'ER β possède une affinité pour la quercétine plus grande que celle de l'ER α (Ascenzi *et al.* 2006).

- Les co-facteurs

Les co-activateurs des ERs ont été beaucoup étudiés. L'interaction des ERs avec différents co-activateurs stabilise la formation du complexe d'initiation transcriptionnelle et facilite l'accès des *trans*-facteurs aux *cis*-éléments. La première famille de co-activateurs à avoir été identifiée se compose de 3 membres SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), SRC-2 et SRC-3. La protéine SRC-1 en est le fondateur. cette famille de protéines de 160 kDa (p160), interagit avec de nombreux récepteurs nucléaires de façon ligand-dépendante (Onate *et al.* 1995). Chez le poulet, comme chez l'homme, trois protéines de la famille SRC ont été identifiées (Arai *et al.* 2001) ; ces protéines de 160 kDa ont des structures similaires à leurs homologues de mammifères. Ces co-activateurs possèdent trois motifs LXXLL aussi appelés NR-box qui interviennent dans l'interaction avec la région AF2. Les expériences de liaison ER-SRC/p160 montrent différentes affinités suivant les ligands : l'oestradiol promeut la liaison d'ER avec SRC/p160, alors que le tamoxifène, le raloxifène et l'ICI-182,780 inhibent cette dernière (Cheskis *et al.* 2003). Ces co-activateurs possèdent deux régions d'activation

transcriptionnelle : AD1 et AD2.

En dehors des protéines qui se lient au domaine AF2, le steroid receptor RNA activator (SRA) est un ARN identifié comme un coactivateur interagissant avec AF1 (Lanz *et al.* 1999).

De nombreux facteurs de transcription peuvent aussi induire la trans-activité des ERs sans avoir une interaction directe.

Le domaine AD1 peut recruter des histone acétyl transférases comme CBP/p300, et le domaine AD2 peut recruter des protéine arginine méthyltransférases (PRMTs, ou CARM pour coactivator-associated arginine methyltransferase). Les séquences d'acides aminés et les structures génomiques des PRMTs chez les poissons sont conservées par rapport aux homologues humains, ce qui suggère des activités protéiques similaires (Hung & Li 2004). La protéine PMRT7 a été récemment montrée coopérer avec un facteur spécifique du testicule : CTCFL/BORIS, facteur qui est exprimé dans les cellules germinales mâles pendant l'embryogenèse (Jelinic *et al.* 2006). Un gros complexe co-activateur appelé « Thyroid Hormone Receptor Associated Protein/Vitamine D receptor – integrating protein (TRAP/DRIP) » intervient dans un second temps pour connecter les ERs à la machinerie de transcription. En effet, la liaison de ces différentes molécules aux ERs se fait de façon séquentielle. Des études réalisées sur le promoteur du gène ps2 dans les cellules traitées à l'E₂ montrent que lorsque SRC-1 est associé au récepteur ER α , TRAP/DRIP ne l'est pas et réciproquement (Burakov *et al.* 2002).

Le fait que les ligands naturels des ERs soient des agonistes, suggère que le rôle des récepteurs nucléaires est d'augmenter l'expression transcriptionnelle des gènes cibles. Néanmoins les co-répresseurs doivent exister, pour pouvoir stopper l'action des hormones naturelles circulantes anormalement élevées dans les organismes. Par exemple, le répresseur REA (repressor of estrogen receptor activity, REA) perturbe la liaison d'ER avec SRC-1 (Martini *et al.* 2000).

Le DBD joue un rôle clef dans la dimérisation et dans la liaison à des séquences d'ADN spécifiques, les ERE dans les promoteurs des gènes cibles. Cette région est la plus conservée

entre ER α et ER β . Ce DBD a une forme globulaire contenant deux hélices α perpendiculaires, formant la base d'un noyau hydrophobe. Les DBD de ER α et ER β contiennent tous deux 8 cystéines conservées réparties en deux groupes de 4. Chaque groupe est impliqué dans la co-ordination d'un atome de Zinc. Cependant ces structures seraient un peu différentes de celles trouvées dans les domaines à doigt de Zinc classique.

Le premier doigt de Zinc contient une boîte proximale (P-box) impliquée dans la reconnaissance de l'ADN. Le second contient une boîte distale (D-box) impliquée dans la dimérisation ADN-dépendante. La séquence d'acides aminés de la P-box est identique entre ER α et ER β . Il n'est donc pas surprenant que les deux récepteurs puissent se fixer aux mêmes séquences d'ADN et avec des affinités comparables. La séquence consensus minimale est une répétition palindromique inversée : 5'-GGTCAnn nTGACC-3'.

Pour tous les récepteurs de la sous famille RN3, la boîte D fournit une surface permettant aux ER de se dimériser tête-beche même en absence de l'ADN. ER α et ER β , lorsqu'ils sont coexprimés, peuvent contribuer aux réponses biologiques soit comme homodimères, soit comme hétérodimères. De nombreuses études suggèrent qu'ER β pourrait moduler négativement l'activité d'ER α .

- Les mécanismes non classiques

Alternativement les effets des ERs pourraient être ligand indépendants. Les facteurs de croissance comme par exemple EGF (epidermal growth factor, EGF) et IGF-1 (insulin-like growth factor 1), et l'AMPc intracellulaire pourraient activer les ERs et induire une augmentation de l'expression des gènes cibles des ERs (Smith 1998). Les domaines de trans-activation AF1 et AF2 sont impliqués dans ces mécanismes, ce qui suggère la participation des co-activateurs classiques des ERs (Smith 1998). Chez le poulet, l'activation de l'adénylate cyclase dans l'oviducte, avec la production d'AMPc, permet une induction de l'expression d'ovalbumine (Evans & McKnight 1984). Chez le poisson *Micropogonias*

undulatus, l'homologue de la protéine GPR30 humaine est supposée être l'ER membranaire, qui est impliqué dans l'inhibition de la maturation des ovocytes par les œstrogènes *via* l'activation de l'AMPC (Pang *et al.* 2008).

Les ERs activés par leur ligands pourraient activer aussi l'expression des gènes cibles *via* des éléments *cis* non ERE, notamment les sites AP1 avec la participation des protéines Fos et Jun, et les sites SP1 riches en GC (Kushner *et al.* 2000). ER α et β fonctionnent différemment sur le site AP1 : en se liant avec l'estradiol, ER α exerce une trans-activation pour le gène cible mais ER β une inhibition (Paech *et al.* 1997).

III.2.2d Expression des ERs dans la différenciation gonadique

Chez la tortue *Trachemys scripta*, dont le sexe est déterminé par la température, l'expression d'ER apparaît précocement et devient plus forte à température féminisante au début de la période thermosensible, ce qui suggère l'importance des processus ER dépendants dans une différenciation sexuelle dépendante de la température (Bergeron *et al.* 1998). Certaines régions cérébrales où s'expriment les ERs pourraient aussi être des tissus cibles de l'effet de la température, comme cela est montré chez le lézard *Eublepharis macularius* (Rhen & Crews 2001). Chez ce lézard, la régulation de l'expression d'ER dans l'hypothalamus ventromédian est différente selon les sexes, ce qui suggère son implication dans les comportements sexuels chez les adultes (Wennstrom *et al.* 2003). Chez le poisson *Sparus aurata*, l'expression d'ER α montre une distribution restreinte dans le testicule, le foie et le coeur ; par contre l'expression d'ER β a été trouvée dans l'ovaire, le testicule, le foie, l'intestin et le rein (Socorro *et al.* 2000).

Dans l'embryon de poulet, ER est exprimé dans les gonades uniquement du côté gauche chez le mâle et la femelle (Nakabayashi *et al.* 1998; Bruggeman *et al.* 2002). Un traitement par les oestrogènes entre 5 et 14 jours d'incubation n'aboutit pas à induire l'expression d'ER dans les gonades droites, ce qui montre que l'absence d'expression d'ER dans les gonades

droites n'est pas le fruit d'une régulation négative, mais est bien la cause du développement ovarien du côté gauche. Chez *Coturnix japonica*, l'expression d'ER β est détectée dans les zones cérébrales liées aux comportements sexuels (Axelsson *et al.* 2007).

Chez *X. laevis*, l'expression d'ER augmente juste après l'éclosion et persiste jusqu'à la fin de la métamorphose (Bogi *et al.* 2002). Chez cette même espèce, deux isoformes d'ER α ont été identifiées, ER α 1 est exprimé dans le foie, le cerveau, l'ovaire et l'oviducte ; tandis que ER α 2 est principalement exprimé dans les muscles laryngiens (Wu *et al.* 2003). Ces isoformes peuvent être tissu et/ou cellule spécifiques. Chez le xénope les différentes isoformes peuvent partager les mêmes mécanismes de fonctionnement mais entraîner des effets physiologiques opposés. Chez la salamandre géante du Japon *Andrias japonicus*, l'expression d'ER α est détectée dans l'ovaire, le foie et le rein (Katsu *et al.* 2006). Dans le testicule du triton *Triturus marmoratus*, ER α et β sont exprimés dans les cellules germinales et les cellules somatiques (Arenas *et al.* 2001).

Dans l'épididyme et le testicule humains, l'expression d'ER α est plus faible que celle de β . A 7 semaines de gestation, ER β est présent dans l'épithélium et le stroma des canaux efférents mais ER α est seulement présent dans l'épithélium. A 12 semaines, dans le testicule, les cellules de Leydig expriment ER α et ER β et les spermatozoïdes expriment la forme tronquée d'ER α où l'exon 1 est absent (Carreau *et al.* 2006). Bien que les oestrogènes ne semblent pas intervenir dans la différenciation ovarienne chez les mammifères, les expériences d'inactivation d'ER ont montré que les oestrogènes sont nécessaires au maintien de la différenciation ovarienne après la naissance. En effet, chez les souris qui présentent une double inactivation d'ER α et β (ER $\alpha\beta$ KO) l'ovaire présente une trans-différenciation des follicules en tubes séminifères. Les structures présentent les marqueurs de cellules de Sertoli, comme l'AMH et SOX9 (Couse *et al.* 1999; Dupont *et al.* 2003). Selon l'étude de mutagenèse ER β -/- sur la lignée germinale mâle de souris, le nombre des gonocytes est augmenté du fait d'une vitesse apoptotique ralentie, ce qui suggère un effet inhibiteur d'ER β sur la multiplication des cellules germinales chez le mâle. Par contre, il n'y a pas d'effet sur les

cellules de Sertoli et de Leydig, donc sur la production de testostérone (Delbes *et al.* 2004).

III.2.3 Récepteurs des androgènes

III.2.3a Evolution et spécificité structurale

Chez les vertébrés, tous les récepteurs des androgènes pourraient être issus d'un même gène ancestral : le récepteur orphelin SF1 (Thornton & Kelley 1998). Les récepteurs des androgènes (AR ou NR3C4) appartiennent à la même sous famille de récepteurs nucléaires que les récepteurs des oestrogènes. Chez l'homme, la protéine possède 919 acides aminés mais des variations peuvent exister en raison de la présence de séquences poly-glutamine et poly-glycine de longueur variable. La protéine migre lors d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide avec une masse moléculaire apparente de 110kDa. L'AR est codé par un seul gène localisé sur le chromosome X.

Comme les autres récepteurs nucléaires, l'AR se compose de différents domaines.

1) NTD. Le domaine de transactivation AF1 est compris dans le NTD. Sa fonction nécessite seulement quelques régions conservées, les autres séquences divergentes servant au repliement protéique. Deux sous régions nommées Tau-1 (Transcription activation unit 1) et Tau-5 ont été identifiées (Jenster *et al.* 1995). Tau-1 serait dépendant du LBD alors que Tau-5 serait une séquence d'activation autonome qui ne nécessite pas la présence du LBD. Tau-5 interagit fortement avec les co-activateurs de la famille SRC/p160. C'est aussi la séquence cible de la kinase PRK1 (PKC related kinase1) qui permet une suractivation du récepteur. Le motif poly-glutamine situé au niveau du NTD joue un rôle important dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle (MacLean *et al.* 1997; Zitzmann *et al.* 2005). Chez l'homme la longueur de ce segment poly-glutamine (variant de 9 à 36 résidus) est inversement corrélée avec la capacité de liaison d'AR avec ses coactivateurs, et donc exerce un effet négatif pour l'androgénicité. L'influence de ce polymorphisme atteint de nombreux tissus cibles comme la

prostate, le testicule, le système osseux, les cheveux et de nombreux facteurs métaboliques et physiologiques (Zitzmann & Nieschlag 2003). Le domaine poly-glycine (fait de 10 à 30 résidus) est situé dans le motif Tau-5.

Une spécificité du récepteur des androgènes est de montrer une forte interaction entre le NTD et le CTD, et plus précisément le LBD. Le motif de la région N-terminale qui possède la plus forte interaction avec le LBD est la séquence ²³FQNLF²⁷. Des interactions indirectes entre NTD et LBD existent également. Une telle interaction peut être réalisée par les co-activateurs SRC/p160. Dans les cellules exprimant les protéines d'AR double fluorescentes, l'interaction N-/C- terminale se produit dans le cytoplasme après la liaison d'un agoniste (van Royen *et al.* 2007).

2) DBD. Le DBD, notamment les doigts de zinc, est très conservé. Trois acides aminés, Gly⁵⁷⁷-Ser⁵⁷⁸-Val⁵⁷⁹, dans le premier doigt de zinc contiennent les informations pour la reconnaissance des éléments de réponse sur l'ADN. Cinq acides aminés dans le deuxième doigt de zinc servent à stabiliser la liaison entre récepteur et ADN, en contactant le groupe ribose-phosphate (MacLean *et al.* 1997). D'autres acides aminés contenus dans les doigts de zinc sont nécessaires pour la fonction normale de l'AR. Le résidu A⁵⁷³ situé dans le premier doigt de zinc facilite probablement l'homodimérisation de l'AR.

3) La région charnière. Cette région située entre la dernière hélice α du DBD et la première hélice α du LBD joue un rôle important. Elle comprend un signal de localisation nucléaire. Elle comporte également une extension C-terminale (CTE) jouant un rôle dans la liaison à l'ADN, en particulier sur des éléments de réponse spécifiques de l'AR (c'est à dire non reconnus par d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur des glucocorticoïdes). Le résidu Ser⁶⁵⁰ peut être phosphorylé. Il jouerait un rôle dans la translocation.

4) LBD. Le fait que le LBD de l'AR ait moins évolué que la même région d'autres récepteurs stéroïdiens suppose que ses acides aminés sont très importants pour la liaison aux androgènes. Ceci explique pourquoi beaucoup de composés chimiques synthétiques ou naturels interagissent avec l'ER, mais très peu avec l'AR. Chez l'homme, les résidus de 866 à

889 déterminent l'affinité du récepteur par rapport aux ligands, qu'ils soient agonistes ou antagonistes (Thornton & Kelley 1998). Comme pour les ERs et la plupart des récepteurs nucléaires, le LBD comprend 12 hélices α qui s'organisent en sandwich avec une cavité centrale pour la fixation du ligand. 18 résidus des hélices 3, 5 et 11 entrent en interaction avec le ligand. L'activation du récepteur sera conditionnée par le positionnement de l'hélice α H12 qui viendra fermer le site de fixation du ligand et permettra la formation d'une région hydrophobe à la surface du LBD. Cette région sert de point d'ancrage pour différents co-activateurs.

5) Sites de phosphorylation. Plusieurs sites de phosphorylation (acide aminé sérine et/ou thréonine) ont été identifiés dans la séquence de l'AR (Zhou *et al.* 1995a; Gioeli *et al.* 2002). La phosphorylation intervient lorsque l'AR est activé par son ligand et elle est probablement nécessaire pour la translocation nucléaire (Ikonen *et al.* 1994).

III.2.3b Mécanisme de fonctionnement

L'AR possède une forte affinité pour les androgènes comme la testostérone et la DHT, mais pas pour d'autres stéroïdes de structure similaire. L'affinité est trois fois plus forte pour la DHT que pour la testostérone (Zhou *et al.* 1995b). Plus la concentration d'androgènes est importante, plus la dissociation du complexe hormone-récepteur sera rapide.

La signalisation des androgènes peut passer par la voie transcription-dépendante (génomique) et/ou la voie indépendante (non génomique). Tout dépend de la nature des androgènes, des tissus cibles et de la localisation cellulaire de l'AR dans ces tissus (Lutz *et al.* 2003). La voie génomique de transactivation de l'AR comprend les étapes communes à tous les récepteurs nucléaires. L'AR non activé est associé aux protéines HSPs (Heat Shock Proteins : HSPs) et reste principalement dans le compartiment cytoplasmique. Une fois qu'il est activé par la liaison avec un androgène, il se dissocie de l'HSP et se dimérise. La phosphorylation est primordiale pour la translocation dans le compartiment nucléaire (Kesler

et al. 2007). L'effet androgénique se manifeste par la fixation des AR dimérisés sur un élément de réponse 5'AGAACANNNTGTTCT-3' (Androgen Response Element : ARE) situé dans les promoteurs de gènes cibles (Gao *et al.* 2005). Cette séquence consensus est reconnue non seulement par l'AR, mais aussi par les GR, PR et MR. Néanmoins, d'autres séquences nucléotidiques ont été décrites. Elles sont reconnues par l'AR mais pas par le GR par exemple. Elles sont décrites comme des ARE sélectifs (Claessens *et al.* 2008). Ces séquences s'organisent en répétitions directes partielles plutôt qu'en répétitions inversées du même motif 5'-TGTCT-3'. L'action génomique des androgènes nécessite toujours d'autres protéines corégulatrices, coactivateurs ou corépresseurs. Les protéines SRCs participent aux processus de transactivation des récepteurs nucléaires, y compris de l'AR, *via* le motif riche en leucine (LXXLL). Les spécificités tissulaires des androgènes se manifestent donc selon la nature et la concentration des ligands, la stabilité de la liaison entre androgènes et AR, le promoteur utilisé dans les tissus cibles et les interactions entre protéines corégulatrices et les promoteurs.

Les signalisations non génomiques des androgènes se caractérisent par leur réaction rapide, et souvent s'associent avec les voies de signalisation membranaires (Gao *et al.* 2005). Chez *X. laevis*, la maturation des ovocytes pourrait être liée à l'activation de l'AR. Il a été montré que ce dernier intervient de façon transcription indépendante, probablement via une voie de signalisation utilisant une protéine G membranaire (Lutz *et al.* 2003). Chez cette même espèce, l'AR pourrait être actif de manière ligand indépendante lorsque son taux d'expression est élevé (Huang *et al.* 2002).

III.2.3c Expression, distribution tissulaire et fonction dans la gonadogenèse

Par rapport aux récepteurs des oestrogènes, l'implication du récepteur des androgènes dans la différenciation gonadique a été peu étudiée.

Les androgènes, en particulier les androgènes 11-oxygénés, jouent un rôle important dans la différenciation sexuelle chez les téléostéens (Borg, 1994). Chez les poissons,

L'importance de l'AR dans la différenciation sexuelle a été prouvée, et des sous types d'AR ont été découverts (Ikeuchi *et al.* 2001). Chez *Anguilla japonica*, la 11-kétotestostérone serait le ligand naturel de l'AR (Todo *et al.* 1999). Chez le bar, au cours de la différenciation des gonades, l'expression de l'AR est d'abord faible dans les deux sexes puis augmente et devient plus forte chez les mâles que chez les femelles à 250 dph (days post hatching) ce qui correspond au début de la différenciation mâle (Blazquez & Piferrer 2005; Piferrer *et al.* 2005). De même, chez *Acanthopagrus schlegeli*, une espèce hermaphrodite protandre, la décroissance du taux d'expression de l'AR pourrait être associée au changement de sexe mâle en femelle (He *et al.* 2003b).

Chez les amphibiens, différentes études ont porté sur le récepteur des androgènes dans le testicule adulte ou dans le cerveau mais peu ont porté sur la différenciation gonadique. Dans le testicule de *Triturus marmoratus marmoratus*, la protéine AR est détectée dans les cellules folliculaires constituant les cystes (équivalent des cellules de Sertoli) ainsi que dans les cellules interstitielles pendant la spermiogenèse et la période quiescente, mais pas durant la période proliférative. En revanche, la protéine AR est présente dans les cellules germinales (des cellules germinales primordiales aux spermatoocytes) pendant tout le cycle annuel (Arenas *et al.* 2001). Chez la grenouille *Rana rugosa* (génotype ZZ/ZW), l'AR n'est pas exprimé chez les individus femelles WW, ce qui suggère que la différenciation femelle peut se dérouler en absence d'AR et que le gène AR ou le gène qui régule l'expression d'AR, se situe sur le chromosome Z (Ohtani *et al.* 2003). Chez cette même espèce, l'expression d'AR est plus élevée dans les testicules, ce taux élevé d'AR inhiberait directement ou indirectement l'aromatase. Chez *Rana esculenta*, un récepteur des androgènes a été aussi identifié dans les régions hypothalamique et extrahypothalamique du cerveau (Paolucci 2003).

Dans l'embryon de souris à 17/18 jours (postcoitum), l'expression d'AR est concentrée dans les canaux de Wolff et les cellules mésenchymateuses qui l'entourent, ce qui indique la future différenciation des structures mâles et un probable contrôle négatif de la formation du vagin (Drews *et al.* 2001). La présence d'AR dans les cellules de Sertoli a été montrée

nécessaire pour la fin de la méiose des spermatides (Holdcraft & Braun 2004; De *et al.* 2004). Les souris mâles AR knockout (ARKO) présentent le syndrome de testicule féminisant (mutation Tfm) (Kato *et al.* 2004a; Matsumoto *et al.* 2005). Ces individus mâles présentent une apparence femelle, les tractus génitaux mâles ne sont pas développés et la spermatogenèse dans les testicules est arrêtée (Matsumoto *et al.* 2008). Les souris femelles ARKO, en revanche, présentent le syndrome d'insuffisance ovarienne précoce. Ces individus femelles ont une apparence normale, néanmoins la folliculogenèse est endommagée et les ovaires présentent de nombreux follicules atrétiques, ce qui explique le nombre diminué de descendants par portée (Matsumoto *et al.* 2008).

IV. Impacts des perturbateurs endocriniens sur la différenciation du sexe

IV.1 Terminologie

Depuis une cinquantaine d'années, de nombreux effets de la pollution ont été démontrés chez de nombreux Vertébrés. Différentes définitions des molécules en cause ont été données, cependant des ambiguïtés sont souvent rencontrées. Selon Kavlock *et al.*, un perturbateur endocrinien est un agent exogène qui interfère avec la production, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination d'hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation des processus de développement (Kavlock *et al.* 1996). L'organisation américaine NRDC (Natural Resources Defense Council, NRDC) définit de façon similaire les EDCs comme des molécules de synthèse qui, lorsqu'elles sont absorbées par les organismes, imitent ou bloquent les hormones et perturbent le fonctionnement des organismes *via* l'altération du taux normal d'hormones et/ou de la production d'hormones ou en changeant leur mode de fonctionnement (NRDC, 1998). En 2002 l'organisation mondiale de la santé a défini un perturbateur endocrinien de la façon suivante : une substance ou un mélange exogène qui modifie la ou les fonctions du système endocrinien et entraîne par la suite des effets nocifs sur la santé d'un organisme, de ses descendants ou de sous-populations (WHO, 2002).

Les perturbateurs endocriniens comprennent une grande variété d'agents chimiques, y compris des hormones naturelles ou synthétiques, certains composants végétaux, des pesticides, des molécules utilisées dans l'industrie plastique, des produits de consommation et divers polluants. Certains de ces perturbateurs endocriniens sont dégradés rapidement dans l'environnement et/ou dans les organismes alors que d'autres persistent et se dispersent dans notre environnement.

De très nombreuses études montrent des effets divers sur des populations naturelles. Par exemple, dans le Michigan, des malformations des membres, des doigts, de la musculature

IV. Impacts des perturbateurs endocriniens sur la différenciation du sexe

ainsi que des anomalies au niveau des yeux et du système nerveux central ont été découvertes dans les populations de *Rana clamitans* en liaison avec la présence dans l'environnement d'insecticides organochlorés, de PCBs et de métaux lourds (Gilliland *et al.* 2001). De telles malformations pourraient être dues à des mimétiques environnementaux des rétinoïdes (Alsop *et al.* 2004). Dans la suite du manuscrit, nous nous concentrerons sur les effets touchant la reproduction.

IV.2 Perturbateurs endocriniens et reproduction

Les études épidémiologiques portant sur les 50 dernières années ont relevé un déclin de la qualité du sperme chez les hommes, et parallèlement une augmentation de l'incidence du cancer des testicules chez les hommes et du cancer du sein chez les femmes (Herbst *et al.* 1971; Auger *et al.* 1995). Il est également à signaler une fréquence accrue de cryptorchidisme, d'hypospadias et de demandes de reproduction assistée (Wang & Baskin 2008). En 2001, il fut proposé que tous ces effets aient une cause commune et le terme de syndrome de dysgénésie testiculaire a été employé pour rassembler ces anomalies de l'appareil reproducteur. Les études épidémiologiques avaient également démontré une variation géographique de ces atteintes, suggérant une influence environnementale (Carlsen *et al.* 1992; Sharpe 1993; Auger *et al.* 1995; Van *et al.* 1996; Irvine *et al.* 1996; Sharpe 2006). Il a été proposé que ces troubles résultent d'une toxicité endocrinienne causée par des agents chimiques lors d'une exposition *in utero*. Une des données les plus bouleversantes de ces dernières années concernant l'influence de l'environnement réside dans le caractère permanent, transmissible aux générations suivantes de ces anomalies programmées lors de l'exposition foetale (Newbold *et al.* 2006). L'observation de populations animales dans des milieux pollués, a aussi mis en évidence de graves désordres de la fonction de reproduction, que ce soit chez les mâles ou chez les femelles.

Ces effets varient de changements subtils de la physiologie et des comportements sexuels

à des anomalies embryonnaires et à l'altération permanente de la différenciation sexuelle (Guillette, Jr. *et al.* 1995). La plupart des données proviennent des pays industriels : Europe et Amérique du Nord. Nous ne citerons ici que quelques exemples pris dans plusieurs classes de vertébrés.

Chez les poissons, la voie la plus efficace d'exposition des jeunes individus est le transfert maternel des EDCs hydrophobes dans les réserves lipidiques. De plus, l'activité très limitée des enzymes de biotransformation et d'excrétion chez les jeunes poissons pourrait maximiser l'exposition aux EDCs pendant des périodes critiques du développement. Une inhibition de la croissance testiculaire a été démontrée chez des truites d'une rivière contaminée par des alkylphénols ; cette inhibition et le degré de formation d'ovotestis sont liés à la période d'exposition aux oestrogéno-mimétiques, (Tyler *et al.* 1998). Une diminution de succès de l'éclosion chez les poissons provenant des rivières contaminées aux PCB et/ou PAH (polyaromatic hydrocarbons, PAH) aux Etats-unis a été documentée (Rhodes *et al.* 2005).

En ce qui concerne les amphibiens, outre le fait de posséder une peau hautement perméable qui les rend particulièrement vulnérables aux contaminants chimiques, il est important de rappeler qu'ils se reproduisent et se développent dans un environnement aquatique. Si ces aspects de leur cycle de vie devaient se réaliser dans des milieux contaminés par des EDC, cela pourrait avoir de graves répercussions sur les individus et les populations (Hayes *et al.* 2006). *X. laevis* et *R. temporaria* traités à l'eau récoltée dans une rivière polluée montrent une augmentation de l'expression de la vitéllogénine chez les individus femelles (Bogi *et al.* 2003) et des changements des paramètres du développement testiculaire (Cevasco *et al.* 2008). Aucune donnée ne montre une cause directe entre EDCs et déclin des populations naturelles d'amphibiens.

En Floride, l'observation fréquente d'un micropénis chez les alligators a été associée à un accident survenu dans une usine chimique produisant du difocol (Colborn & Smolen 1996). Des cas de cryptorchidie chez des panthères américaines ont été reliés à l'utilisation de DDE

et de PCB (Colborn & Smolen 1996). Une baisse drastique de la fertilité des visons du lac Michigan a été rapportée à une consommation de poissons du lac contaminé par le PCB, un composant des équipements électriques. Ceci illustre au passage le phénomène de transfert des polluants le long de la chaîne alimentaire.

Chez les oiseaux, de nombreuses anomalies sont liées aux EDCs. Les oiseaux provenant de sites pollués présentent un déficit d'instinct reproducteur, une diminution des comportements de couvaison et de défense des nids (Kozie & Anderson 1991). Les embryons des mouettes provenant de zones contaminées par la dioxine et les PCBs présentent une féminisation testiculaire (Hart *et al.* 2003). Une réduction de l'épaisseur de la coquille de nombreux oiseaux est imputée à une contamination par le pesticide DDT, les effets étant dus à son métabolite la DDE (dichlorodiphényl dichloroéthylène, DDE) (Elliott *et al.* 1988).

IV.3 Méthodes d'identification des EDC

Les observations des troubles décrits précédemment en relation avec des contaminants chimiques ont conduit à de nombreuses études *in vivo* afin d'évaluer le caractère « perturbateur endocrinien » de divers composés et de comprendre ensuite leur mode d'action. Il est possible de tester la liaison de la molécule aux récepteurs des stéroïdes et d'analyser des gènes dont l'expression est régulée par les stéroïdes dans des cellules cultivées en présence d'un polluant (Nesaretnam *et al.* 1996; Levy *et al.* 2004; Kase *et al.* 2008). L'analyse du taux d'ER libre immédiatement après ajout dans le milieu de culture d'hépatocytes et l'analyse de l'expression d'ER peuvent aussi être effectuées (Lutz *et al.* 2005). Il est possible également de mesurer en présence de polluants la prolifération de cellules stéroïdes-dépendantes comme par exemple les cellules cancéreuses mammaires MCF7 (Aube *et al.* 2008).

Des méthodes *in vivo* ont également été développées.

Les études visant à déterminer les effets au cours du développement sont réalisées en utilisant des jeunes ou des larves d'espèces aquatiques comme les poissons ou les amphibiens.

Ceux-ci peuvent être élevées dans une eau dans laquelle le composé à tester est ajouté (Seki *et al.* 2003; Oka *et al.* 2003; Flament *et al.* 2003; Hayes *et al.* 2006). La vitellogénine chez les poissons mâles pourrait être un bon marqueur pour l'exposition à des composés potentiellement oestrogéno-mimétiques. En effet, chez les poissons mâles, la vitellogénine n'est pas synthétisée, mais la synthèse de cette molécule est induite par une exposition aux oestrogènes de façon dose dépendante (Emmerson *et al.* 1979). L'induction de l'expression et de l'activité de certaines mono-oxygénases spécifiques pourrait être aussi un bon indicateur de l'exposition aux polluants (Kleinow *et al.* 1987).

Chez les mammifères comme la souris ou le rat, les composés sont administrés à la mère gestante et les effets peuvent être analysés soit sur les foetus, les nouveaux-nés, les adultes voire sur les générations suivantes (Alworth *et al.* 2002; Ho *et al.* 2006). Un test fréquemment utilisé est le développement de l'utérus chez le rat ou la souris immature ou ovariectomisée, en effet le développement de l'utérus est oestrogène-dépendant. Les oestrogènes dans un premier temps induisent la perméabilité vasculaire de l'utérus et entraînent une accumulation d'eau. Secondairement, une prolifération et l'hypertrophie des cellules se traduisent par l'augmentation de poids de l'utérus (Yamasaki *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 2007). D'autres tests consistant à mesurer la kératinisation et l'ouverture vaginale chez le rat ou la souris immature ou ovariectomisée ont été aussi utilisés (Paris *et al.* 1973).

IV.4 Mécanismes d'action des EDCs

La majorité des études actuelles montrent que les EDCs interviennent, au niveau d'une liaison directe avec les récepteurs hormonaux en mimant ou bloquant les actions hormonales (Pocar *et al.* 2003). Cependant des actions au niveau de la synthèse, du métabolisme, de la distribution et/ou de la clearance d'hormones endogènes sont aussi possibles (Sharpe 2006).

IV.4.1 Les oestrogéno-mimétiques *via* les ERs

De nombreux composés chimiques possèdent une activité oestrogénique *in vitro* et *in vivo* chez les Vertébrés, y compris le MXC (methoxychlor, MXC) (Nimrod & Benson 1997; Pickford & Morris 2003), l'octylphénol (4OP), le nonylphénol, le bisphénol A (BPA), le bisphénol B, la phytoestrogène génisteine et la mycotoxine fongique zéaralénone (Huang *et al.* 2005). Ces molécules ont la capacité de se lier aux ERs de poissons, avec une affinité similaire par rapport aux ERs des mammifères (Loomis & Thomas 1999). D'après les études de liaison compétitive, le p-nonylphénol, le bisphénol-A, le méthoxychlor, le pentachlorophénol, le DDT (dichlorodiphényl trichloroéthane, DDT) et ses métabolites sont capables d'entrer en compétition avec l'œstradiol pour la liaison aux ERs (Nimrod & Benson 1997; Gaido *et al.* 1997; Danzo 1997; Chou & Dietrich 1999; Champagne *et al.* 2006). Chez la souris, l'octaméthylcyclotérasiloxane exerce de nombreux effets oestrogéniques médiés par une liaison au récepteur ER α (He *et al.* 2003a), notamment l'augmentation de l'activité de peroxydase utérine et du poids de l'utérus. Chez l'homme, le phytoestrogène 4-éthoxyméthylphénol agit comme un agoniste des ERs et son effet au niveau transcriptionnel peut être atténué par l'ajout de l'anti-oestrogène tamoxifen (Pearce *et al.* 2003).

IV.4.2 Les anti-androgènes *via* l'AR

De très nombreux xéno-estrogènes sont connus mais de plus en plus de travaux montrent une action des EDCs par altération des voies androgéniques : on nomme ces molécules des anti-androgènes (Kelce & Wilson 1997). Par exemple, la vinclozoline est un fongicide antagoniste de l'AR. Ses métabolites M1 et M2 sont des inhibiteurs compétitifs des androgènes au niveau de la liaison à l'AR chez les mammifères ; ils inhibent l'activité transcriptionnelle de l'AR induite par la DHT (Kelce *et al.* 1997). Un traitement à la vinclozoline induit l'intersexualité chez le médaka (Kiparissis *et al.* 2003). D'autres

substances comme le DDE (You *et al.* 1999), le pesticide fénitrothione (Tamura *et al.* 2003) et le fongicide procymidone (Ostby *et al.* 1999) se comportent comme des antagonistes de l'AR.

Chez le Rat castré, l'administration de la testostérone augmente le poids des organes sexuels et la concentration sanguine de testostérone, tandis qu'un traitement avec la vinclozoline et le DDE entraîne une diminution du poids des organes sexuels (Kang *et al.* 2004).

La vinclozoline se lie au récepteur des androgènes mais induit un changement conformationnel qui est différent de celui induit par la DHT (Kelce & Wilson 1997; Sohoni & Sumpter 1998). L'administration de vinclozoline chez le Rat, par injection ou par voie orale, diminue les comportements mâles et la production de sperme et augmente l'expression génique d'enzymes de la stéroïdogénèse comme P450c17 et 3 β HSD (Hotchkiss *et al.* 2003) (Kubota *et al.* 2003).

Le PBDE (polybrominated diphenyl ether) peut inhiber la liaison entre les androgènes et leur récepteur, et les transactivations induites par la DHT (Stoker *et al.* 2005). Chez le reptile *Alligator mississippiensis*, l'administration de DDE à température intermédiaire entraîne un sexe ratio biaisé du côté femelle, mais aucun effet n'est observé à température masculinisante (Milnes *et al.* 2005).

IV.4.3 Voies indépendantes des récepteurs des stéroïdes sexuels

Au lieu de se lier aux récepteurs stéroïdiens, certains EDC peuvent altérer la synthèse, le métabolisme ou encore le transport des hormones. Chez les poissons, certains EDC, comme par exemple 4OP, BPA, zéaralénone, génistein, diéthylstilbestrol, et éthynylestradiol, peuvent se lier avec la protéine de liaison des stéroïdes, responsable du transport des stéroïdes dans le système sanguin, et modifier la fonction normale des hormones (Tollefsen 2002; Gale *et al.* 2004; Tollefsen *et al.* 2004). L'altération peut concerner le contrôle hormonal du système endocrinien, comme par exemple la sécrétion de la gonadotrophine chez le mouton (Evans *et*

al. 2004), ou encore la sécrétion de l'hormone lutéinisante chez l'homme (Akingbemi *et al.* 2004). L'équilibre hormonal est souvent le résultat de ces contrôles hormonaux : chez le xénope, une concentration plus élevée d'E₂ et plus basse de testostérone sont constatées après un traitement à l'atrazine (Hecker *et al.* 2005). L'expression et l'activité d'enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse peuvent être aussi affectées. Chez *Rana catesbeiana*, l'expression dimorphique du gène Sf1, régulateur de l'expression d'enzymes de la stéroïdogénèse, est modifiée par le traitement au 4OP (Mayer *et al.* 2003). Dans les cellules immortelles de tortue, l'activité aromatasase peut être induite par les EDC (Keller & Clellan-Green 2004). Chez le poisson zèbre, l'expression de l'aromatase est aussi induite par divers EDC (Kazeto *et al.* 2004). Chez l'homme, dans les cellules de la granulosa, l'activité de l'aromatase et de la 3βHSD sont inhibées par les phytoestrogènes (Lacey *et al.* 2005). Enfin les EDC peuvent aussi altérer la maturation des ovocytes ou encore entraîner les cellules germinales vers l'apoptose (Minervini *et al.* 2001; Kim *et al.* 2003).

IV.4.4 Les agonistes du AhR (aryl hydrocarbon receptor, AhR)

AhR est un récepteur cytoplasmique. Sa voie de signalisation est activée par le TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzyl-*p*-dioxin, TCDD) (Hankinson 1995). Ce récepteur fonctionne de façon similaire aux récepteurs nucléaires. Avec la participation de son partenaire ARNT (AhR nuclear translocator, ARNT), il régule l'expression de gènes cibles, y compris les CYP450 (Quattrochi & Tukey 1993), la NADPH quinone réductase (Favreau & Pickett 1991), l'aldéhyde déshydrogénase de classe 3 (Asman *et al.* 1993) et la glutathion S-transférase (Paulson *et al.* 1990). Il se lie à l'élément de réponse à la dioxine GCGTG (Dong *et al.* 1996). AhR pourrait influencer l'action des récepteurs nucléaires en inhibant leur trans-activité, notamment celle des ERs (Gillesby *et al.* 1997; Wang *et al.* 2001) et de l'AR.

V. Hypothèses et objectifs de la thèse

V. Hypothèses et objectifs de la thèse

La compréhension du déterminisme et de la différenciation du sexe est importante non seulement d'un point de vue fondamental mais aussi pour appliquer les connaissances soit à l'élevage d'espèces d'intérêt agronomique, soit à la thérapeutique de pathologies ou de malformations de l'appareil uro-génital, soit à la détection d'effets néfastes de certains polluants.

Pleurodeles waltl est un vertébré qui peut aisément être exposé à un environnement aquatique pollué. En effet, la différenciation du sexe chez cette espèce est sensible aux traitements expérimentaux réalisés avec des hormones stéroïdes de telle façon que le pleurodèle pourrait être un bon indicateur de la présence de perturbateurs endocriniens dans le milieu. Connaissant la sensibilité de cet amphibien aux stéroïdes exogènes (inversions sexuelles fonctionnelles), nous avons cherché à savoir si la différenciation gonadique du pleurodèle pouvait être affectée par la présence de molécules susceptibles d'être des perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique. Les résultats obtenus pourront être confrontés à ceux déjà publiés chez d'autres modèles réactifs à certaines molécules présentes dans l'environnement.

Dans une première partie du travail de thèse, nous allons étudier des molécules susceptibles de se comporter comme des perturbateurs endocriniens. Nous allons exposer des larves de pleurodèle à différents composés décrits chez d'autres espèces comme perturbateurs endocriniens. Le choix de ces polluants est effectué en collaboration avec le Dr. Hoffmann du centre de recherche Gabriel Lippmann au Luxembourg. Les larves de pleurodèle sont soumises à ces polluants ajoutés à l'eau d'élevage pendant la période hormono-sensible et analysées après la métamorphose pour déterminer l'état de différenciation gonadique.

Les stéroïdes jouent un rôle primordial dans la différenciation sexuelle chez le pleurodèle, et le but de la deuxième partie de la thèse sera de comprendre comment et à quel moment les stéroïdes sexuels interviennent dans la différenciation du sexe. Les récepteurs des stéroïdes

(récepteurs des oestrogènes et des androgènes) sont-ils présents chez le pleurodèle ? A quel moment sont-ils exprimés et dans quels types cellulaires ? Les récepteurs stéroïdiens jouent-ils un rôle important au moment du déclenchement de la différenciation ou bien plus tardivement au cours de la différenciation gonadique ? Nous chercherons à établir une corrélation entre cette expression et l'action des hormones stéroïdes située dans différents contextes génétiques ou physiologiques. Nous examinerons en particulier les cas d'inversions sexuelles obtenues par l'administration d'hormones stéroïdiennes exogènes ou de perturbateurs endocriniens ; les résultats d'expériences de parabioses pourront également être utilisées en tant que référence concernant l'action d'hormones circulantes.

Les études au niveau moléculaire visent tout d'abord à cloner les cDNAs et les régions régulatrices des récepteurs des hormones stéroïdiennes, puis à étudier leur expression au cours de la différenciation gonadique normale et lors d'inversions sexuelles obtenues par la température ou par des traitements aux stéroïdes. Les traitements visant à inverser le sexe seront réalisés dans les conditions décrites auparavant. L'élevage de larves ZW à 32°C du stade 42 au stade 54 induit leur développement en mâle. Les traitements aux stéroïdes sont classiquement réalisés avec l'oestradiol (100µg/L), la testostérone (500µg/L) et la DHT (400µg/L) pendant la période hormono-sensible.

Ces études nécessitent une partie méthodologique importante avec la mise au point de techniques comme la PCR en temps réel, l'hybridation *in toto* et la production de protéines recombinantes afin de développer des immuns-sérums contre ces récepteurs, permettant de réaliser des analyses par western blotting et immunohistologie.

Une première approche de l'étude de la régulation de l'expression des récepteurs fera l'objet d'une collaboration avec le Dr. Diederich du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer au Luxembourg.

VI. Résultats

VI. Résultats

VI.1 Effets des hormones stéroïdiennes et de polluants sur la différenciation du sexe du pleurodèle

Ethinylestradiol causes feminization in the urodele amphibian Pleurodeles waltl with a higher potency than 17 β -estradiol. KO Chia-I, Chesnel Amand, Dumond Hélène, Flament Stéphane*, Chardard Dominique. Soumis    Aquatic Toxicology.

Les perturbateurs endocriniens sont des molécules pouvant interférer avec les fonctions des hormones naturelles. Ces molécules sont d'origine très variées, polluants issus de l'agriculture, de l'industrie chimique, hormones synthétiques issues de l'industrie pharmaceutique, phyto-hormones naturelles. Nombre d'entre elles se comportent comme des oestrogéno-mimétiques ou des anti-androgènes et peuvent interférer avec les fonctions de reproduction. En effet, de nombreuses molécules entraînent chez de nombreuses espèces en laboratoire ou en milieu naturel des perturbations de la reproduction allant d'altérations du comportement reproducteur à des malformations génitales et des inversions sexuelles complètes.

Du fait de l'importance primordiale des oestrogènes dans la différenciation ovarienne et de sa sensibilité aux oestrogènes exogènes, le pleurodèle pourrait constituer un indicateur du potentiel oestrogéno-mimétique de certains polluants. De plus, le sexe génétique des larves de pleurodèle peut être facilement déterminé, ce qui constitue un avantage intéressant pour l'identification d'individus sexuellement inversés par rapport à d'autres espèces d'amphibiens chez lesquelles la sex-ratio est le seul critère utilisable.

Nous avons donc cherché à identifier des molécules se comportant comme des perturbateurs endocriniens chez le pleurodèle. Pour cela, différents oestrogéno-mimétiques ont été appliqués sur les larves pendant la période de différenciation gonadique. Les analyses ont été réalisées à la fin du traitement, à l'issue de la métamorphose. Le choix des molécules

ainsi que les doses utilisées ont été déterminés d'après les éléments de la littérature sur d'autres espèces, notamment des amphibiens.

Le butylhydroxyanisole, le 4-octylphénol, le bisphénol-A, l'atrazine et la zéaralénone n'ont entraîné aucune perturbation de la différenciation gonadique chez les larves ZZ et à aucune des concentrations décrites comme efficaces chez d'autres espèces comme le xénope par exemple. En revanche, l'éthynylestradiol (EE₂) s'est révélé un plus puissant inducteur de la différenciation sexuelle que l'oestradiol (E₂) : en effet, à 10µg/L, l'E₂ n'entraîne que la formation d'intersexués chez la moitié des larves ZZ alors qu'à la même concentration, l'EE₂ provoque l'inversion sexuelle de toutes les larves ZZ traitées. A 100ng/L, ni l'E₂, ni l'EE₂ ne présentent d'effet sur la différenciation testiculaire alors que les doses inférieures entraînent une déviation de la sexe-ratio vers le sexe femelle chez le xénope.

Nos résultats suggèrent que le pleurodèle est moins sensible aux oestrogènes, et aux oestrogéno-mimétiques en général, que certains anoures. Néanmoins, nous avons observé un important effet aussi bien de l'E₂ que de l'EE₂ sur le développement des oviductes. Les mâles de pleurodèle possèdent les canaux de Müller susceptibles de se différencier en oviductes lors d'injection d'oestradiol. A forte dose (100µg/L), l'E₂ provoque l'inversion des gonades des larves mâles en ovaire mais il a un effet inhibiteur sur le développement des oviductes. A faible dose, l'E₂ et l'EE₂ n'ont aucun effet sur la différenciation des testicules mais provoquent la différenciation des oviductes. Les larves mâles traitées par l'E₂ et l'EE₂ à 100ng/L présentent des oviductes de diamètre trois fois plus important que ceux de larves femelles du même stade. A des concentrations voisines de celles mesurées dans les milieux pollués, si l'EE₂ ne semble pas pouvoir provoquer d'inversion gonadique, il pourrait néanmoins provoquer le développement d'oviductes chez les mâles.

**Ethinylestradiol induces feminization in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*
with a higher potency than 17 β -estradiol**

Chia-I KO, Amand Chesnel, Hélène Dumond, Stéphane Flament*, Dominique Chardard.

Nancy-Université, Faculté des sciences, EA3442, Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Boulevard des Aiguillettes, BP239, 54506 Vandoeuvre-l  s-nancy cedex, France

* Corresponding author. Fax: +33 3 8368 4196.

E-mail address: stephane.flament@sbiol.uhp-nancy.fr (S. Flament).

Keywords: ethinylestradiol, endocrine disruptor chemical, estradiol, feminization, sex reversal, amphibian.

Abstract

Numerous man-made chemicals can mimic endogenous hormones, especially estrogens. Due to the role played by steroids in sex differentiation and in reproductive physiology, pollution by such endocrine-disrupting compounds could be involved in the decline of amphibian species. Indeed, several studies have reported dramatic effects such as female biased sex ratios indicating male to female sex reversal. However, most experiments have been performed in anurans and little is known about the effects on urodeles. In the newt *Pleurodeles waltl*, the role of estrogens in female sex differentiation is well established. In this study, *Pleurodeles waltl* larvae were exposed to 4-octylphenol, butylhydroxyanisole, bisphenol-A, atrazine, zearalenone and ethynylestradiol (EE₂) from stage 51 to metamorphosis, at concentrations ranging from 1x10⁻⁵M to 1x10⁻¹¹M. Metamorphosed animals were subjected to morphological or histological studies to identify gonad phenotype. A biochemical analysis allowed to identify sex genotype for each animal (ZZ in males, ZW in females). The potential estrogenic effects were compared with those of estradiol benzoate. A feminizing effect was only observed in animals exposed to EE₂. This compound induced male to female sex reversal in 100% of the larvae at a lower concentration than those required with estradiol (3.4x10⁻⁸M versus 2.7x10⁻⁷M). Moreover, like estradiol, EE₂ had a dose-dependent effect on oviduct differentiation in ZZ larvae: in larvae exposed to 3.4x10⁻¹⁰M, oviduct diameter was larger than in those exposed to 3.4x10⁻⁸M (118 ± 27 μm versus 30 ± 6 μm). Overall, our results suggest that oviduct differentiation in male individuals of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* could be a useful indicator for assuming potential estrogenic activity of xenobiotic compounds.

1. Introduction

During the past century, we have become vigilant about several substances, known as endocrine disruptor chemicals (EDCs). An endocrine disruptor was defined as “an exogenous agent that interferes with the production, release, transport, metabolism, binding, action or elimination of natural hormone in the body, responsible for the maintenance of homeostasis and the regulation of developmental processes” (Kavlock *et al.*, 1996). Some of these chemicals were produced in an effort to increase agricultural productivity, such as herbicides, pesticides and fungicides. Other compounds were associated with modern manufacturing processes, like plasticizers, polystyrenes, polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzodioxins and alkylphenolic compounds. Another group of EDCs includes some phyto-hormones and synthetic hormones for human treatments. These different groups of molecules have been found in the aquatic environment where they can disrupt hormone-dependent functions such as reproduction.

Several studies have suggested a causal link between exposure to endocrine-disrupting pollutants and reproductive abnormalities (Sharara *et al.*, 1998; Toppari *et al.*, 1996; Sharpe, 2006; Pocar *et al.*, 2003; Gandolfi *et al.*, 2002). Various effects were observed following EDC treatments depending on species, doses and developmental window of application. For example, reproductive organs malformations, hermaphroditism, hatching success and altered sex steroid levels have been documented in fish populations (Mandich *et al.*, 2007; Urushitani *et al.*, 2007; Tokumoto *et al.*, 2005; Batty and Lim, 1999). EDCs could affect gonadogenesis in non mammalian vertebrates in which steroid hormones play a very important role in gonad

differentiation (Baroiller and D'Cotta, 2001; Hayes, 1998; Pieau *et al.*, 2001; Vaillant *et al.*, 2001). Therefore, periods of development during which sex differentiation occurs can be sensitive to EDCs (Guillette, Jr. *et al.*, 1995). In many non mammalian species, partial or even complete sex reversal effects have been reported (Kloas *et al.*, 1999). For example, ovo-testis formation induced by alkylphenolic compounds was reported in the fish *Oryzias latipes* (Seki *et al.*, 2003). In anuran amphibians, numerous substances including BPA, 4-octylphenol (4OP), nonylphenol (NP), ethynylestradiol (EE₂), atrazine and PCBs, have been demonstrated to exert feminizing effects varying from hermaphroditism to sex reversal (Levy *et al.*, 2004; Mosconi *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2003; Pettersson *et al.*, 2006). Environmentally relevant doses of bisphenol-A (BPA) have been documented to reverse gonadal sex and alter gonadal histoarchitecture in *Caiman latirostris* (Stoker *et al.*, 2003).

In regard to the sensitivity to EDCs, attention should be paid to amphibians. Indeed, a recent report concluded that approximately 30% of the species are threatened (Stuart *et al.*, 2004). The reasons for the amphibians decline are unknown but the involvement of factors such as EDCs has been suggested. In contrast to anuran amphibians that were subjected to numerous studies, the effects of EDCs on urodele amphibian reproduction is not well documented. In our laboratory, we have been studying Iberian ribbed newt *Pleurodeles waltl* sex differentiation for two decades. This urodele amphibian shows a ZZ/ZW genetic mode of sex determination in which the W chromosome induces a female differentiation. As in other non mammalian vertebrates, steroid hormones play a key role in the process leading to gonad differentiation. ER α displays a dimorphic gonadal expression with a higher level of mRNA observed in the differentiating ovary

(Ko *et al.*, 2008). During *Pleurodeles* ovary development, the activity of the estrogen synthesizing enzyme aromatase increases whereas it stays at a very low level in male gonad (Chardard *et al.*, 1995). This difference in enzyme activity is related to differences in aromatase gene expression (Kuntz *et al.*, 2003b). When estrogen production is impaired by a treatment with an aromatase inhibitor, a female to male sex reversal is observed (Chardard and Dournon, 1999). The importance of steroid hormones during the sex differentiation process is also illustrated by treatments with exogenous steroids. Rearing *Pleurodeles waltl* ZZ larvae in the presence of estradiol or testosterone induces a male to female sex reversal (Kuntz *et al.*, 2003a; Gallien, 1951). Conversely, a female to male sex reversal can be obtained by using non-aromatisable androgens such as dihydrotestosterone (DHT) (Chardard *et al.*, 2003). Finally, exposure of larvae to high temperature (32°C versus 20°C) induces a female to male sex reversal due to the inhibition of aromatase and estrogen production (Dournon and Houillon, 1985; Kuntz *et al.*, 2003b; Dumond *et al.*, 2008). Interestingly, Müllerian ducts are maintained in males of *Pleurodeles waltl* even at adulthood, and they can differentiate into oviducts upon estradiol treatment (Tiffoche *et al.*, 1993).

Due to the ability of *Pleurodeles waltl* larvae to respond to exogenous steroids added to the rearing water, we tested here the sex reversing potency of EDCs which have been already studied in anuran amphibians: 4-octylphenol (a degradation product of polyetoxylates widely used in laundry detergents, surface cleaners, and in connection with the use of pesticides and herbicides), butylhydroxyanisole (BHA) (an antioxydant used to prolong the shelf life of foodstuffs), bisphenol-A (BPA) (an intermediate used primarily in the production of polycarbonates and epoxyresins), atrazine (probably the most widely used herbicide in the world), zearalenone (a phenolic compound produced

by fungi of *Fusarium* species that can contaminate many important crops) and ethynylestradiol (EE₂)(a component of the contraceptive pill). We took advantage of the possibility to determine the genotype of each individual by the analysis of the sex chromosomes marker peptidase 1 (Ferrier, 1980). We compared the effects of the different compounds to those of estradiol. Our results show that except EE₂, the other molecules do not induce sex reversal in this species. EE₂ had a higher sex reversing effect than E₂ and both compounds could stimulate oviduct differentiation at a concentration below those acting to the gonads.

Treatment	Offspring reference	Concentration	Number of treated larvae	Number of surviving larvae	Sexual genotype		Sexual phenotype		Sex reversal (%)
					ZZ	ZW	Male	Female	
Absolute ethanol	G03	3.4×10 ⁻⁴ M	20	15	10	5	10	5	0
	L03	3.4×10 ⁻⁴ M	20	19	10	9	10	9	0
	G04	3.4×10 ⁻⁴ M	20	11	6	5	6	5	0
	W05	3.4×10 ⁻⁴ M	20	12	6	6	6	6	0
Estradiol (E ₂)	G03	2.7×10 ⁻⁷ M	20	11	3	8	0	11	100
	L03	2.7×10 ⁻⁷ M	20	17	11	6	0	17	100
	G04	2.7×10 ⁻⁷ M	20	11	6	5	0	11	100
	W05	2.7×10 ⁻⁷ M	20	14	7	7	0	14	100
Butyl hydroxyanisol (BHA)	G04	1×10 ⁻⁵ M	20	12	5	7	5	7	0
	L03	1×10 ⁻⁶ M	20	18	14	4	14	4	0
		1×10 ⁻⁷ M	20	14	8	6	8	6	0
		1×10 ⁻⁸ M	20	14	7	7	7	7	0
4-Octylphenol (4OP)	G03	1×10 ⁻⁶ M	20	12	5	7	5	7	0
		1×10 ⁻⁷ M	20	20	8	12	8	12	0
		1×10 ⁻⁸ M	20	18	10	8	10	8	0
Bisphenol-A (BPA)	G04	1×10 ⁻⁵ M	20	0	-	-	-	-	-
		1×10 ⁻⁶ M	20	13	8	5	8	5	0
		1×10 ⁻⁷ M	20	17	10	7	10	7	0
Atrazine	W05	1×10 ⁻⁹ M	20	15	7	8	7	8	0
		1×10 ⁻¹⁰ M	20	17	7	10	7	10	0
		1×10 ⁻¹¹ M	20	12	5	7	5	7	0
Zearalenone	W05	1×10 ⁻⁷ M	20	12	3	9	3	9	0
		1×10 ⁻⁸ M	20	18	7	11	7	11	0
		1×10 ⁻⁹ M	20	9	1	8	1	8	0

Table 1. Effects of various EDCs on sex differentiation of *Pleurodeles waltl*.

2. Material and methods

2.1 Animals and treatments

P. waltl larvae were reared in tap water at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ in our laboratory. All experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines (Comité régional d'éthique Nancy-Lorraine). Developmental stages were determined by macroscopic observation according to Gallien and Durocher (1957). Standard larvae (ZZ or ZW) were obtained from crosses between ZZ males and ZW females (progenies with 1/1 sex ratio). All male progenies ZZ were obtained from crosses between a ZZ male and a neo-female (estradiol sex reversed ZZ male). EDCs and estradiol were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France), except for 4-octylphenol, (Acros-Organics, Geel, Belgium). Concentrated solutions of EDCs and exogenous estradiol were prepared in absolute ethanol. Treatments were performed between stage 51 where gonads are undifferentiated and stage 56 (end of metamorphosis) where gonads are fully differentiated. This period is described as a hormone sensitive period based on the sex reversal experiments performed with estradiol benzoate, testosterone and DHT (Dumond *et al.*, 2008). Water (with or without treatment) was replaced three times a week after feeding the larvae. Benzocaïne (Sigma) at 0.03% was used to anesthetize animals before dissection. Gonadal phenotype was diagnosed at the end of treatment by macroscopic observation and by using histological methods.

A first set of treatments was performed with four standard progenies (Table 1). For each group, 20 larvae of unknown genotype were reared in tanks with two liters of water containing different concentrations of test compounds as indicated in table 1. Treatments with $2.7 \times 10^{-7}\text{M}$ benzoate estradiol and $3.4 \times 10^{-4}\text{M}$ absolute ethanol were

Treatment	Concentration	Number of ZZ larvae	Number of surviving larvae	Sexual phenotype			sex reversal	Oviduct development	Oviduct mean diameter (μm)
				Female	Intersex	Male			
Control ZZ	$3.4 \times 10^{-4}\text{M}$	10	5	0	0	5	0%	No	32.7 ± 6.9
Estradiol (E_2)	$2.7 \times 10^{-8}\text{M}$ ($10\mu\text{g/L}$)	10	4	0	2	2	50%	Yes	49 ± 24
	$2.7 \times 10^{-10}\text{M}$ (100ng/L)	10	2	0	0	2	0%	Yes	126 ± 31
Ethinylestradiol (EE_2)	$3.4 \times 10^{-8}\text{M}$ ($10\mu\text{g/L}$)	10	5	5	0	0	100%	Yes	30 ± 6
	$3.4 \times 10^{-10}\text{M}$ (100ng/L)	10	4	0	0	4	0%	Yes	118 ± 27

Table 2. Effects of E_2 and EE_2 on sex differentiation of ZZ *Pleurodeles waltl* larvae.

used as controls for each progeny. At stage 56 (*i.e.* the end of metamorphosis, when external gills have completely disappeared), sex genotype of each animal was determined by peptidase 1 analysis (see below) and compared with sexual phenotype diagnosed under macroscopic observation of the gonads. Histological studies were performed to confirm the gonadal phenotype.

A second set of treatments was performed with all male progenies (Table 2). For each group, 10 larvae were treated with different concentrations of estradiol (2.7×10^{-8} and 2.7×10^{-10} M) and EE₂ (3.4×10^{-8} and 3.4×10^{-10} M). At stage 55, (during metamorphosis), the sex phenotype was diagnosed under macroscopic observation of the gonads, which were fixed for histological analysis.

2.2 Peptidase-1 analysis

The ZW or ZZ sexual genotype was determined by electrophoresis patterning of the two (W- and/or Z-linked) peptidase-1 isoforms, as described previously (Ferrier, 1980). Briefly, homogenates of tail biopsies were subjected to a non-denaturing starch gel electrophoresis. The activity of peptidase-1 was revealed using MgCl₂ 50mg, Val-Leu (SIGMA) 50mg, snake venom (L-amino oxydase) (SIGMA) 6mg, peroxydase (SIGMA) 10mg, O-dianisidine 40mg in Tris buffer 0,2M pH 8,5. A three banded pattern indicates a ZW genotype whereas a one banded pattern indicates a ZZ genotype.

2.3 Histology

At the end of treatments, gonads with mesonephros were fixed at room temperature

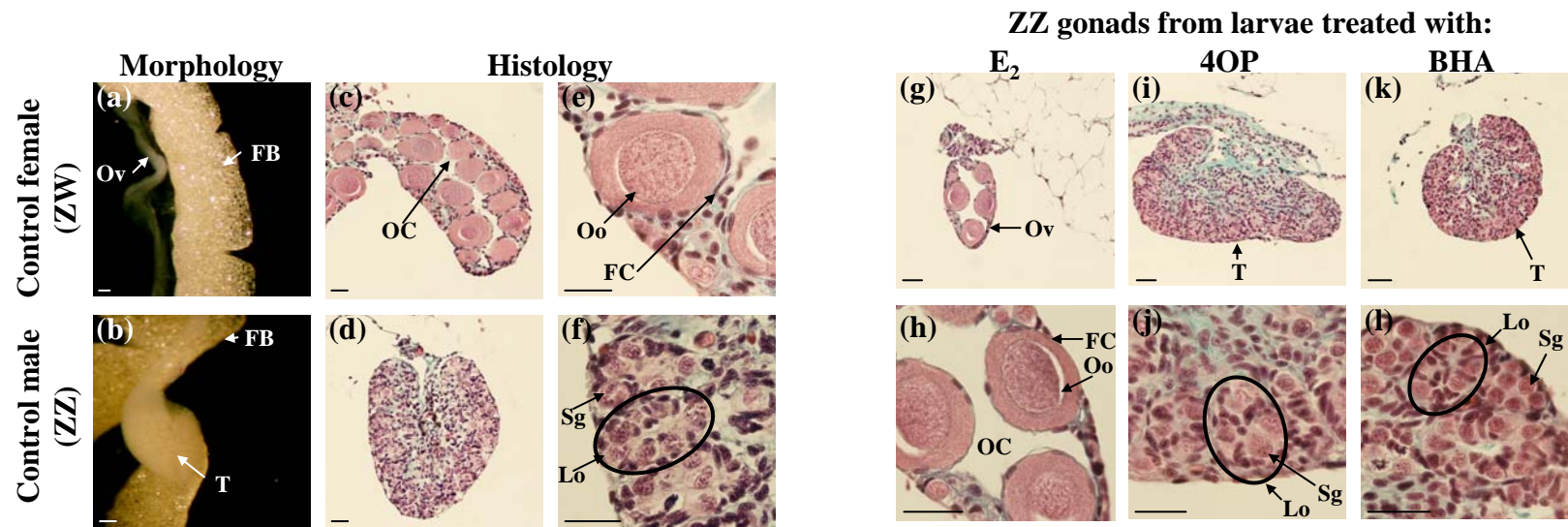


Figure 1. Gonads of *Pleurodeles waltl* after metamorphosis (stage 56). A control ovary (a, c and e) and a control testis (b, d and f) are shown after macroscopic (a,b) and histological observations (c-f). Histological sections of gonads from animals treated with E₂ (g and h), 4OP (i and j) and BHA (k and l) are also shown. Ov – ovary; FB = fat body; T = testis; OC = ovarian cavity; Oo = oocyte; FC = follicle cell; GC = germ cell; Lo = lobule. Bars represent 1 mm (a,b) and 50 μ m (c-l).

for one day in Bouin's solution containing 70% saturated picric acid, 8% formaldehyde and 5% glacial acetic acid. After deshydration in graded series of ethanol, fixed samples were embedded in paraffin and cut at 7µm thickness. Seriated sections were stained with hematoxylin-eosin mounted with Eukitt mounting medium and observed on a Eclipse 80: microscope (Nikon).

3. Results

3.1 BHA, 4OP, BPA, atrazine and zearalenone do not reverse the sex of *Pleurodeles waltl*

In order to know if the sexual differentiation of *Pleurodeles* could be affected in case of contamination of the water with EDCs, BHA, 4OP, BPA, atrazine and zearalenone were used. These compounds were chosen for their known endocrine disrupter activities especially in anuran amphibians. The doses tested were in the range of those described for other species (Table 1).

In control animals, at stage 56 (end of metamorphosis) males and females can be distinguished by gonad morphology under macroscopic observation (Fig. 1a and b). Ovaries are flattened narrow bands, with early follicles appearing white. Histologically, these organs are characterized by cortical development and medullar regression which leads to a central ovarian cavity (Fig. 1c). The ovary wall contains numerous follicles, *i.e.* oocytes surrounded by somatic cells. At this stage, oocytes are blocked in meiotic prophase I; they display a large nucleus and begin to accumulate yolk platelets in the cytoplasm (Fig. 1e). At the same stage, testes are thin in their anterior part whereas their

posterior region is enlarged, forming the first testis lobe. These gonads are characterized by medullary development. Germ cells are located in spherical structures, called cysts (analogous to seminiferous tubules) located in lobules. Later, during the juvenile period, germ cells in a cyst will evolve synchronously through the spermatogenetic process. In this study, all absolute ethanol treated controls displayed a gonadal sex differentiation that was always in accordance to the genotypic sex of the individual.

In EDC-treated animals, we did not observe any alteration of larval development except with BPA which was lethal after the first week of treatment at the concentration of $1 \times 10^{-5} \text{M}$. Some mortality was observed in the different groups, but this was due to cannibalism and was not specific of a treatment (Table 1). At the end of metamorphosis, the macroscopic examination of the gonads revealed that at the doses tested, none of these five compounds could induce sex reversal: ZZ individuals had normal testes and ZW normal ovaries (Table 1). In all EDC treated animals, the absence of effect observed at the dissection was confirmed by histology. For example, in Fig.1 we show sections of ZZ larvae treated with $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 4OP or $1 \times 10^{-5} \text{M}$ BHA: testis morphology is normal with no germ cell or somatic cell abnormality. In contrast, all ZZ larvae exposed to $2.7 \times 10^{-7} \text{M}$ estradiol differentiated ovaries, identical although somewhat smaller than those of control ZW larvae (compare in Fig.1 g, h to c, e).

3.2 EE₂ has a higher male to female sex reversing potency than E₂

EE₂ is commonly used in pharmaceuticals and is one of the most potent estrogenic compounds identified in the aquatic environment (Johnson *et al.*, 2000). Its effects on *Pleurodeles waltl* sex differentiation were compared to the well known effects of E₂,

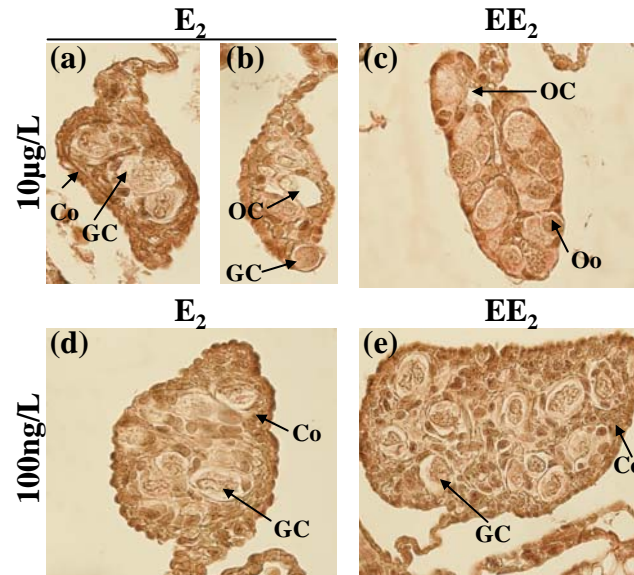


Figure 2. Histological sections of gonads of ZZ *Pleurodeles waltl* treated with E2 and EE2 during larval life. At stage 55, larvae exposed to E2 10 µg/L showed partial sex reversal with gonads showing testis parts (a) and ovarian parts (b). At the same concentration, EE2 induced complete sex reversal with ovary differentiation (c). At 100 ng/L, testis differentiation was not modified by E2 (d) or EE2 (e). Bars represent 50 µm.

and varying doses were similarly applied to the rearing water of all male larvae (ZZ) (Table 2). During these treatments, we observed a high level of mortality due to cannibalism near the period of metamorphosis and consequently treatments were stopped at stage 55. The efficient dose of E₂ commonly used in our lab to obtain 100% sex reversal of ZZ larvae is 2.7×10^{-7} M (100 µg/L). When exposed to 2.7×10^{-8} M (10 µg/L) E₂, 50% of the larvae differentiated normal testes whereas 50% were intersexes: some parts of the gonad look like a testis with germ cells located in the medulla (Fig. 2a) and some other parts look like an ovary with a central cavity and germ cells located in the cortex (Fig. 2b). EE₂ was more efficient than E₂ to induce female differentiation in *Pleurodeles waltl* since it led to sex reversal of all larvae at 3.4×10^{-8} M (10 µg/L): the gonads were typical ovaries with a central cavity and germ cells localized in the cortex (Fig. 2c). At a lower dose (100 ng/L), E₂ (2.7×10^{-10} M) and EE₂ (3.4×10^{-10} M) had no effect on the differentiation of the ZZ gonads which appeared as typical testes (Fig. 2d and e).

3.3 Low dose of E₂ and EE₂ stimulate oviduct differentiation

Since EE₂ was able to induced gonadal sex reversal, we also studied the status of Müllerian ducts (Table 2). Indeed, in urodele amphibians, Müllerian ducts are maintained in males and their differentiation into oviducts can be triggered by E₂ injection, even if this treatment is performed at adulthood (Tiffoche *et al.*, 1993). At stage 55, in control ZZ larvae, the oviduct diameter was 32.7 ± 6.9 µm, with a few epithelial cells lining a small lumen. In ZZ larvae exposed to either E₂ or EE₂, Müllerian ducts differentiation was triggered. Indeed, the lumen was larger, epithelial cells were more numerous and the mean diameter was always higher than those measured in

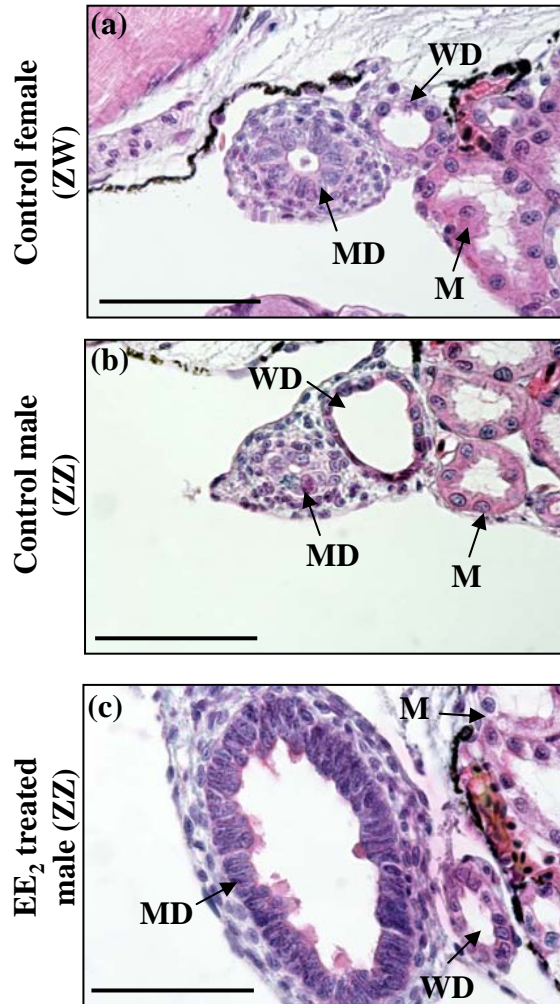


Figure 3. EE2 triggers Müllerian duct differentiation in ZZ *Pleurodeles waltl* larvae. (a) untreated control female, (b) untreated control male, (c) male treated with 100 ng/L EE2. M = mesonephros, MD = Müllerian duct, WD = Wolffian duct. Bars represent 100 μ m.

control ZZ larvae (compare Fig. 3a with b and c). However, the largest oviduct diameter was observed in larvae exposed to the lowest doses of either E₂ ($126 \pm 31 \mu\text{m}$) or EE₂ ($118 \pm 27\mu\text{m}$). This was larger than usually observed in untreated female larvae (ZW) at stage 55 whose oviduct diameter was $44.1 \pm 9.9 \mu\text{m}$.

4. Discussion

Numerous studies have focused on the effects of EDCs on amphibians. However, most studies have been conducted in anuran species and our knowledge about the influence of EDCs on urodele reproduction is very poor. We studied here the effects of several molecules reported as EDCs on sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. The genotype of each animal can be ascertained by the analysis of a sex chromosome marker (peptidase-1) and the comparison between sexual genotype and gonad phenotype is much more interesting than analysis of sex ratio in species in which sexual genotype cannot be identified. Besides, this species is sensitive to steroids that can experimentally induce sex reversal when added to the rearing water (Dumond *et al.*, 2008). This study is one of the first attempts to identify the EDCs that are able to modify sex differentiation of *Pleurodeles waltl*.

Among the EDCs that we ~~have~~ tested, 4OP, BHA, BPA, atrazine and zearalenone, had no influence on sex differentiation of *Pleurodeles waltl* larvae. These data are in contrast with results obtained in *Xenopus laevis* since 1×10^{-7} M BPA, 4OP or BHA can bias the sex ratio towards female sex (Kloas *et al.*, 1999 ; Levy *et al.*, 2004). Similarly, atrazine was shown to cause hermaphroditism in *Xenopus laevis* and *Rana pipiens* at environmentally relevant concentration (0.1 ppb or 4.6×10^{-10} M) (Hayes *et al.*, 2002, 2003). The absence of effects of 4OP, BHA, BPA, atrazine and zearalenone could be due to a reduced sensitivity of *Pleurodeles waltl* gonadogenesis to EDCs. This hypothesis is supported by previous data reporting that sex differentiation was not modified by cadmium exposure while this heavy metal is known to interact with sex steroid receptors in other models (Flament *et al.*, 2003). *Pleurodeles waltl* larvae were

also described to be less sensitive than *Xenopus laevis* to the acute toxicity of cadmium (Mouchet *et al.*, 2007). Such a difference in sensitivity could reflect a difference in pollutant uptake or metabolism. Nevertheless it should be noticed that conflicting results have been obtained with several EDCs in regard to their potency to affect anuran amphibian sex differentiation. For instance, treatment of *Xenopus laevis* tadpoles with BPA at doses up to 500µg/L revealed no significant deviation of sex ratio (Pickford *et al.*, 2003). Besides, intersex individuals of *Xenopus laevis* exposed to atrazine could be only observed at high doses (25µg/L) (Carr *et al.*, 2003). A recent study on atrazine reported a deviation of the sex ratio without intersex at 10 and 100 ppb but no sex reversal at lower doses (Oka *et al.*, 2008). These discrepancies about atrazine and BPA lead to the idea that the development of standardized protocols is required for the evaluation of endocrine disruption (Lutz *et al.*, 2008).

EE₂ was the only EDC tested that we found to induce sex reversal of *Pleurodeles* ZZ larvae. EE₂ had a higher effect than E₂ in promoting ovarian differentiation since it induced complete sex reversal of ZZ larvae at 3.4x10⁻⁸ M (10 µg/L) while E₂ at the same dose induced only ovo-testis formation in 50% of the individuals. This higher sex reversing potency in comparison to E₂ could be explained by a longer half-life of this synthetic estrogen which often persists in the aquasystem (Johnson *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2002). In *Rana pipiens*, larval exposure to 3x10⁻⁹ or 33x10⁻⁹ M EE₂ results in female biased sex-ratios and intersex conditions at metamorphosis (Mackenzie *et al.*, 2003). In *Rana Temporaria*, exposure to 0.06x10⁻⁹ M EE₂ caused female biased sex ratios (Pettersson and Berg, 2007). In *Xenopus tropicalis*, exposure to EE₂ at 6x10⁻¹² M caused female biased sex ratios (72% females) (Gyllenhammar *et al.*, 2008). In *Xenopus laevis*, males exposed to 1x10⁻⁸ M EE₂ also develop testis defects: tubule mean diameter

reduction, spermatogenic nest breakdown, interlobular wall thickening and occurrence of small oocytes within the seminiferous tubules (Cevasco *et al.*, 2008). So, it seems that EE₂-induced sex reversal in *Pleurodeles waltl* is observed at higher doses than in anuran amphibians. Again, this could suggest a reduced sensitivity of *Pleurodeles waltl* gonadogenesis to EDCs.

We also studied the development of Müllerian ducts that is regulated by estrogens. In *Pleurodeles waltl* as in other urodeles, these progenitors of the oviducts appear in both sexes, they develop into oviducts in ZW larvae whereas they persist without differentiation in ZZ larvae. We observed a dose-dependent effect of EE₂ and E₂ on Müllerian ducts development in ZZ larvae with high doses inhibiting and low doses promoting oviduct formation. This is consistent with the fact that ZZ larvae sex reversed by 2.7×10^{-7} M E₂ (100 µg/L) (the condition usually employed in our laboratory) never show differentiated oviducts at metamorphosis and when raised to adulthood, some individuals still lack oviducts (not shown). At low doses (100 ng/L), both EE₂ and E₂ promoted oviduct differentiation which, at the end of metamorphosis, were more developed than in ZW female control larvae. So, EE₂ and E₂ can affect Müllerian duct differentiation at concentrations below those needed to modify the phenotype of the gonad and this leads to individuals with testes and oviducts. In anurans, the situation is different because Müllerian ducts disappear in males as in mammals. However, in *Xenopus tropicalis*, exposure to EE₂ from stage 48 to metamorphosis also induced a dose-dependent increase in the frequency of individuals lacking oviducts at adulthood (Pettersson *et al.*, 2006).

5. Conclusion

The results of our study indicate that in case of exposure to different EDCs during larval life, sex differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* is not affected at concentrations that are efficient in anuran species. However, assessing the risk of endocrine disruption of pollutants in different amphibian species could turn out difficult since responses to steroids in different species are yet very confusing (Hayes 1998). We observed feminizing effects of EE₂ with a higher potency than E₂ itself. EE₂ levels up to 273 ng/L (0.9 nM) have been detected in rivers downstream sewage treatment plants in USA and up to 125 ng/L (0.42 nM) in surface water in Europe (Belfroid et al. 1989; Larsson et al. 1999; Ternes et al. 1999; Kolpin et al. 2002; Pojana et al. 2004). We observed that in *Pleurodeles waltl*, at these environmentally relevant concentrations, there was no gonadal sex reversal. However, the same conditions allow oviduct differentiation in genetically male individuals suggesting that ZZ *Pleurodeles* oviduct differentiation could be a useful indicator for detecting estrogenic compounds.

Acknowledgements

We are grateful to Martine Chillet for her excellent work in histology. We also thank Alexandra Kleinclauss and Elia Bouvry for technical assistance and animal rearing. This study was supported by grants of the “Université Henri Poincaré (BQR)”, of the “Ligue Contre le Cancer ” and of the “Association pour la Recherche sur le Cancer”. Chia-I KO was recipient of grants from the French “Ministère des Affaires Etrangères” and from Luxembourg “Ministère de la Culture, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” (BFR05/010).

References

- Baroiller, J.F., D'Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 130, 399-409.
- Batty, J., Lim, R., 1999. Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 301-307.
- Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schafer, A.J., Rijs, G.B., Wegener, J., Cofino, W.P., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci. Total Environ.* 225(1-2), 101-108.
- Carr, J.A., Gentles, A., Smith, E.E., Goleman, W.L., Urquidi, L.J., Thuett, K., Kendall, R.J., Giesy, J.P., Gross, T.S., Solomon, K.R., Van Der, K.G., 2003. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and

laryngeal morphology. Environ. Toxicol. Chem. 22, 396-405.

Cevasco, A., Urbatzka, R., Bottero, S., Massari, A., Pedemonte, F., Kloas, W., Mandich, A., 2008. Endocrine disrupting chemicals (EDC) with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: II. Effects on gonad histomorphology. Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol. 147, 241-251.

Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C., Dournon, C., 1995. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. Gen. Comp Endocrinol. 99, 100-107.

Chardard, D., Dournon, C., 1999. Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. J. Exp. Zool. 283, 43-50.

Chardard, D., Kuntz, S., Chesnel, A., Flament, S., 2003. Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. J. Exp. Zoolog. A Comp Exp. Biol. 296, 46-55.

Dournon, C., Houillon, C., 1985. Thermosensibilite de la differenciation sexuelle chez l'Amphibien Urodele *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phenotype sexuel de toutes les femelles genetiques sous l'action de la temperature d'eleavage. Reprod. Nutr. Dev. 25, 671-688. Ref Type: Generic

Dumond, H., Kuntz, S., Chesnel, A., Ko, C.I., Wallacides, A., Chardard, D., Flament, S., 2008. Sexual development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Sex Dev. 2, 104-114.

Ferrier, V., Jaylet, A., Cayrol, C., Gasser, F., Buisan, J.J., 1980. Etude electrophoretiques des peptidases erythrocytaires chez *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodele) : mise en evidence d'une liaison avec le sexe. Acad. Sc. Paris ser. D290, 571-574. Ref Type: Generic

Flament, S., Kuntz, S., Chesnel, A., Grillier-Vuissoz, I., Tankozic, C., Penrad-Mobayed, M., Auque, G., Shirali, P., Schroeder, H., Chardard, D., 2003. Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles waltli* (urodele amphibian). Aquat. Toxicol. 64, 143-153.

Gallien, L., 1951. [Unisexual progeny of a female *Pleurodeles Waltlii* Michah, subjected, during the larval stage, to the gynogenic effect of estradiol benzoate.]. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 233, 828-830.

Gallien, L., Durocher, M., 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 91, 97-114.

Gandolfi, F., Pocar, P., Brevini, T.A., Fischer, B., 2002. Impact of endocrine disrupters on ovarian function and embryonic development. *Domest. Anim Endocrinol.* 23, 189-201.

Guillette LJ, Jr., Crain, D.A., Rooney, A.A., Pickford, D.B., 1995. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 7, 157-164.

Gyllenhammar, I., Holm, L., Eklund, R., Berg, C., 2008. Reproductive toxicity in *Xenopus tropicalis* after developmental exposure to environmental concentrations of ethynylestradiol. *Aquat. Toxicol.*

Hayes, T.B., 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J. Exp. Zool.* 281, 373-399.

Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A., 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(8), 5476-5480.

Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A., 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 111, 568-575.

Johnson, A.C., Belfroid, A., Di Corcia, A.D., 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.* 256, 163-173.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104 Suppl 4, 715-740.

Kloas, W., Lutz, I., Einspanier, R., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* 225, 59-68.

Ko, C.I., Chesnel, A., Mazerbourg, S., Kuntz, S., Flament, S., Chardard, D., 2008. Female-enriched expression of ERalpha during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Gen. Comp Endocrinol.* 156, 234-245.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 36(6), 1202-1211.

Kuntz, S., Chardard, D., Chesnel, A., Grillier-Vuissoz, I., Flament, S. 2003a. Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenet. Genome Res.* 101, 283-288.

Kuntz, S., Chesnel, A., Duterque-Coquillaud, M., Grillier-Vuissoz, I., Callier, M., Dournon, C., Flament, S., Chardard, D., 2003b. Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 89-100.

Lai, K.M., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2002. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Sci. Total Environ.* 289, 159-168.

Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson M., Berg, A.H., Olsson, P.-E., Förlin, L., 1999. Ethynylestradiol-an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* 45, 91-97.

Levy, G., Lutz, I., Kruger, A., Kloas, W., 2004. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ. Res.* 94, 102-111.

Lutz, I., Kloas, W., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci. Total Environ.* 225, 49-57.

Lutz, I., Kloas, W., Springer, T.A., Holden, L.R., Wolf, J.C., Krueger, H.O., Hosmer, A.J., 2008. Development, standardization and refinement of procedures for evaluating effects of endocrine active compounds on development and sexual differentiation of *Xenopus laevis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 2031-2048.

Mackenzie, C.A., Berrill, M., Metcalfe, C., Pauli, B.D., 2003. Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2466-2475.

Mandich, A., Bottero, S., Benfenati, E., Cevasco, A., Erratico, C., Maggioni, S., Massari, A., Pedemonte, F., Vigano, L., 2007. In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. *Gen. Comp. Endocrinol.*

Mosconi, G., Carnevali, O., Franzoni, M.F., Cottone, E., Lutz, I., Kloas, W., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Polzonetti-Magni, A.M., 2002. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 125-129.

Mouchet, F., Gauthier, L., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2007. Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. *Environ Toxicol.* 22(4), 422-435.

Ohno, K., Suzuki, S., Fukushima, T., Maeda, M., Santa, T., Imai, K., 2003. Study on interactions of endocrine disruptors with estrogen receptor using fluorescence polarization. *Analyst* 128, 1091-1096.

Oka, T., Tooi, O., Mitsui, N., Miyahara, M., Ohnishi, Y., Takase, M., Kashiwagi, A., Shinkai, T., Santo, N., Iguchi, T., 2008. Effect of atrazine on metamorphosis and sexual

differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquat. Toxicol.* 87, 215-226.

Pettersson, I., Arukwe, A., Lundstedt-Enkel, K., Mortensen, A.S., Berg, C., 2006. Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 79, 356-365.

Pettersson, I., Berg, C., 2007. Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1005-1009.

Pickford, D.B., Hetheridge, M.J., Caunter, J.E., Hall, A.T., Hutchinson, T.H., 2003. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* 53, 223-235.

Pieau, C., Dorizzi, M., Richard-Mercier, N., 2001. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *EXS*, 117-141.

Pocar, P., Brevini, T.A., Fischer, B., Gandolfi, F., 2003. The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction*. 125, 313-325.

Pojana, G., Bonfà, A., Busetti, F., Collarin, A., Marcomini, A., 2004. Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(8), 1874-1880.

Seki, M., Yokota, H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K., 2003. Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1507-1516.

Sharara, F.I., Seifer, D.B., Flaws, J.A., 1998. Environmental toxicants and female

reproduction. *Fertil. Steril.* 70, 613-622.

Sharpe, R.M., 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 20, 91-110.

Stoker, C., Rey, F., Rodriguez, H., Ramos, J.G., Sirosky, P., Larriera, A., Luque, E.H., Munoz-de-Toro, M., 2003. Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen. Comp Endocrinol.* 133, 287-296.

Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783-1786.

Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225(1-2), 81-90.

Tiffoche, C., Chesnel, A., Jegou, P., Le Penne, J.P., 1993. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a *Pleurodeles* lectin. *Eur. J. Biochem.* 213, 901-907.

Tokumoto, T., Tokumoto, M., Nagahama, Y., 2005. Induction and inhibition of oocyte maturation by EDCs in zebrafish. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 69.

Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette LJ, Jr., Jegou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Muller, J., Rajpert-De, M.E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkebaek, N.E., 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens.

Environ. Health Perspect. 104 Suppl 4, 741-803.

Urushitani, H., Katsu, Y., Kato, Y., Tooi, O., Santo, N., Kawashima, Y., Ohta, Y., Kisaka, Y., Lange, A., Tyler, C.R., Johnson, R.D., Iguchi, T., 2007. Medaka (*Oryzias latipes*) for use in evaluating developmental effects of endocrine active chemicals with special reference to gonadal intersex (testis-ova). Environ. Sci. 14, 211-233.

Vaillant, S., Dorizzi, M., Pieau, C., Richard-Mercier, N., 2001. Sex reversal and aromatase in chicken. J. Exp. Zool. 290, 727-740.

VI.2 Récepteur des oestrogènes et différenciation sexuelle du pleurodèle

Pour réaliser l'étude du récepteur des oestrogènes, j'ai été amenée à mettre au point des techniques qui n'étaient pas utilisées au laboratoire. Avant de présenter les résultats, je décrirai la mise au point de ces techniques : hybridation *in toto*, PCR en temps réel et production de protéines recombinantes en vue d'obtenir des immunsérums.

VI.2.1 Echantillons larvaires de pleurodèle

Plusieurs difficultés ont été rencontrées lors des analyses d'expression génique par RT-PCR. D'une part, les gonades chez les animaux pendant le développement larvaire sont très petites. De ce fait, nous sommes contraints de rassembler plusieurs échantillons larvaires pour analyser un stade donné et des variations individuelles peuvent fausser les résultats. D'autre part, les gonades (G) se développent le long du complexe mésonéphros-organe interrénal (MI) et il n'est possible de séparer les gonades de ce complexe qu'à partir du stade 54^{30d}. Aux stades plus précoces, le compartiment MI pourrait éventuellement gêner l'analyse de l'expression de gènes gonadiques, puisqu'à ce jour aucun marqueur génétique, que ce soit dans la partie G ou MI, n'a été identifié chez le pleurodèle. Par conséquent, une méthode complémentaire permettant de visualiser et/ou d'analyser ces expressions géniques étant nécessaire.

VI.2.2 Mises au point des techniques

- Hybridation *in toto*

Pour pouvoir confirmer les résultats d'analyses d'expression obtenus par RT-PCR et les affiner au niveau de la localisation, la technique d'hybridation *in toto* a été employée. Elle a

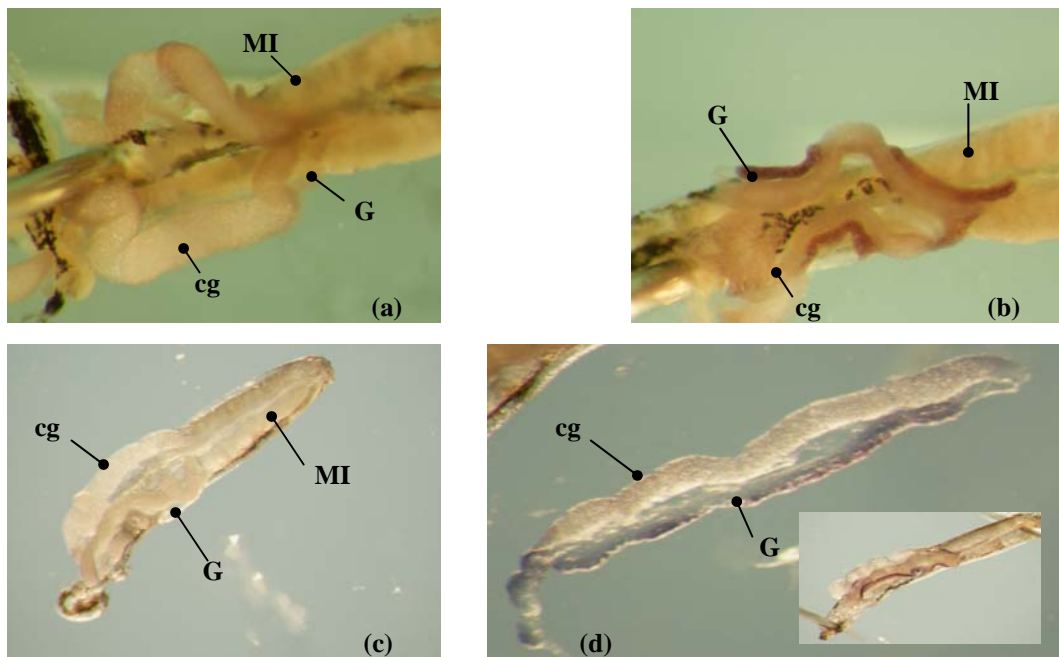


Figure VI-1. Détection de l'expression de l'aromatase par hybridation *in toto* sur des complexes gonades-mésonephros-organe interrénal de larves ZW au stade 54^{60d}. La révélation a été faite avec le système NBT-BCIP (figures A et B), ou avec le BM purple (figures C et D). (a) et (c) hybridations témoins avec une sonde sens, (b) et (d) hybridations avec les sondes anti-sens. MI – mésonephros-organe interrénal ; G – gonade ; cg – corps gras (tissu adipeux associé aux gonades).

été acquise lors d'un stage au centre INRA de Jouy-en-Josas en coopération avec Mme Corinne Cotinot et M. Michel Guillomot, et les mises au point ont été réalisées à Nancy pour adapter la technique aux tissus de pleurodèle.

La mise au point a été réalisée avec le gène aromatase dont le profil d'expression par RT-PCR semi-quantitative a été bien étudié au laboratoire. La stringence joue le rôle le plus important pour éliminer le bruit de fond, pour cela certaines modifications ont été apportées.

La concentration optimale de paraformaldéhyde employée lors de la fixation a été recherchée. En effet les groupes aldéhydes peuvent interagir avec les amines ou les protéines, et ils gênent souvent la reconnaissance anticorps/antigène. Plusieurs durées de fixation et pourcentages de paraformaldéhyde ont été testés. Nous avons opté pour une fixation au paraformaldéhyde à 2% pendant 3 heures. Cela est suffisant pour conserver les structures tissulaires et ne pas générer de bruit de fond.

Initialement nous avons utilisé le sérum de veau foetal (SVF) pour bloquer les sites antigéniques aspécifiques, mais le bruit de fond est important, surtout au niveau du corps gras associé aux gonades. Pour résoudre ce problème, la BSA a été employée et plusieurs concentrations ont été testées, et un blocage avec un tampon contenant 0,5% de BSA pendant une durée de 3 heures a été défini.

Pour révéler les marquages, le BMP (BM Purple, Roche), décrit comme générant moins de bruit de fond, est utilisé à la place du système NBT-BCIP. La durée de révélation est allongée : de 3 heures pour le NBT-BCIP elle est prolongée à 16h avec le BMP à 4°C.

La figure VI-1 illustre la mise au point de l'hybridation *in toto* avec une sonde aromatase chez les femelles ZW²⁰ au stade 54^{60d}. Avec l'application de BMP, le marquage est moins foncé et moins évident qu'avec le NBT-BCIP, mais il n'y a pas de bruit de fond au niveau des corps gras. Ce dernier sert bien de contrôle négatif puisque les études menées par RT-PCR avaient montré que l'aromatase ne s'exprime pas dans ce tissu ni dans le complexe MI. Cet outil permettra ensuite d'analyser l'expression d'autres gènes qui s'expriment à la fois dans

les gonades et les corps gras, comme les récepteurs stéroïdiens par exemple.

Voici une description du protocole que nous avons établi :

Préparation des sondes marquées à la digoxigénine

Les plasmides contenant les séquences des gènes à analyser sont linéalisés avec les enzymes de restriction adéquats. 1µg de plasmides linéalisés est utilisé pour synthétiser les sondes ARN marquées à la digoxigénine (11-DIG-UTP, Roche) par transcription *in vitro*. Le mélange de transcription, 1µg de plasmides linéalisés, tampon de transcription 1X (Fermentas), DIG-NTP mix 2µl (ATP 10mM, GTP 10mM, CTP 10mM, UTP 3,5mM et 11-DIG-UTP 6,5mM, Roche) et 2µl de l'enzyme ARN polymérase (soit T3, T7 ou SP6, Fermentas), est incubé à 37°C pendant deux heures. Après avoir ajouté 1µl de DIG-NTP mix, tampon de transcription 1X et 1µl de l'enzyme ARN polymérase, la transcription est poursuivie une heure. L'efficacité de la synthèse d'ARN est vérifiée par migration de 2,5µl d'ARN transcrit sur gel d'agarose.

Les transcrits sont ensuite précipités par ajout de 3µl de LiCl 5M et 90µl d'éthanol absolu à -20°C pendant 30 minutes. Après centrifugation, les culots sont lavés deux fois avec l'éthanol 70°, séchés et repris dans 50µl d'eau traitée au DEPC additionnée de 1µl de RNasin (Rnase OUT, Invitrogen). La concentration d'ARN transcrit est mesurée au spectrophotomètre et des aliquots de 800ng sont réalisés et conservés à -20°C.

Hybridation *in toto*

Les complexes GMI prélevés par dissection sous loupe binoculaire sont fixés rapidement dans du paraformaldéhyde (Sigma) 2% préparé dans le tampon phosphate 75mM. La fixation dure 3 heures à 4°C, elle est stoppée en rinçant les échantillons avec un tampon phosphate 75mM contenant 0,1% de Tween 20 (Sigma). Pour le stockage, les échantillons sont déshydratés avec le méthanol puis conservés à -20°C.

Avant l'hybridation, les échantillons sont réhydratés dans du méthanol-PBST (PBS1X, Tween 20 0,1%), et perméabilisés par un traitement à la protéinase K (Euromedex) 10µg/mL. Une

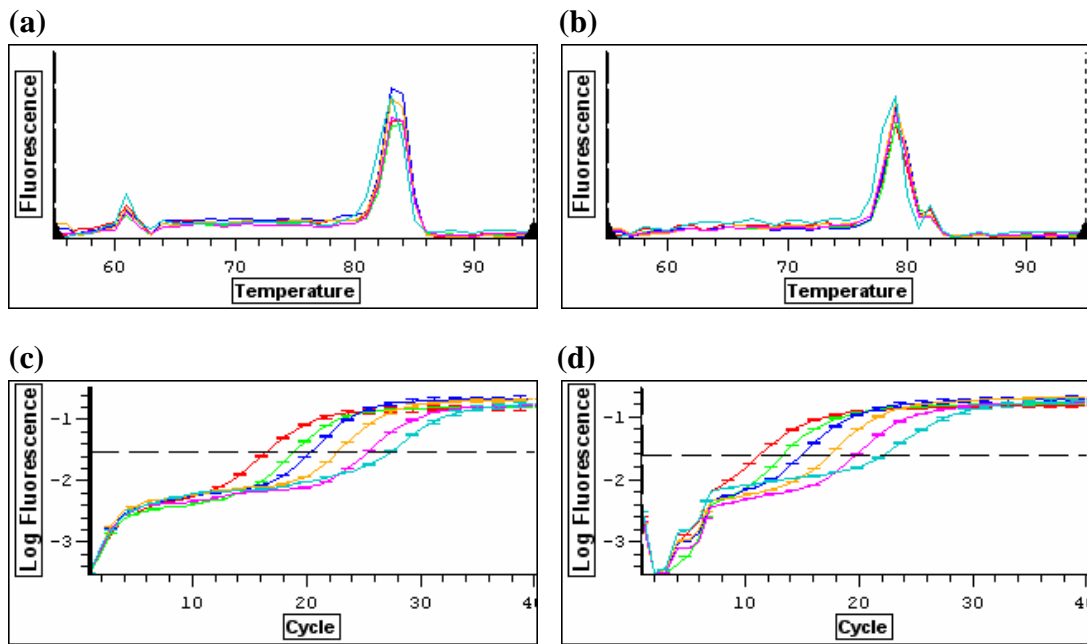


Figure VI-2. Mise au point des PCR quantitatives. (a) courbe de fusion concernant l'amplification de la GAPDH, avec la température d'hybridation de l'amplicon égale à 83°C. (b) courbe de fusion concernant l'aromatase, avec la température d'hybridation de l'amplicon égale à 79°C. (c) courbes de quantification de la gamme d'étalon plasmidique GAPDH. (d) courbes de quantification de la gamme étalon plasmidique aromatasique.

post-fixation au paraformaldéhyde (Sigma) 2% est effectuée. Les échantillons sont ensuite pré-hybridés à 70°C dans du tampon d'hybridation contenant 65% de formamide (Fluka) –(SSC5X et ARNt de levure). L'hybridation a lieu ensuite durant une nuit à la même température en rajoutant les sondes marquées à la concentration de 2ng/μl. Le premier lavage après l'hybridation est fait avec du SSC2X contenant 65% de formamide à 70°C. Les lavages suivants s'effectuent à 65°C avec du SSC2X et du SSC0,2X contenant du Tween 20 (1%). Les échantillons sont ensuite bloqués avec du tampon TBS contenant de la BSA (0,5%) pendant 1 heure, puis l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (anti-DIG-AP Fab fragment, Roche) est dilué 5000 fois dans le même tampon et appliqué pendant une nuit. Le lendemain, une quinzaine de lavages au TBST (TBS + 0,1% Tween20) sont effectués. Finalement le marquage est révélé en appliquant du BMP (BM purple, Roche) pendant une nuit. La visualisation du marquage est réalisée sous la loupe binoculaire.

- PCR en temps réel

Le niveau relatif des transcrits de divers gènes est couramment analysé dans notre laboratoire par une méthode semi-quantitative après électrophorèse réalisée sur gel d'agarose. Nous avons constaté pour l'aromatase que le ratio d'expression différentielle est toujours faible en comparaison avec les résultats de dosages d'activité enzymatique. Par exemple, aux stades 54 et 55 l'expression de l'aromatase chez les femelles (ZW²⁰) est 2,4 et 2,3 fois plus élevée par rapport aux larves mâles (ZZ²⁰), alors que les dosages de l'activité aromatase montrent des rapports de 40 et 100 fois (Kuntz *et al.* 2003a). Pour pouvoir affiner les analyses d'expression, le laboratoire s'est équipé d'un appareil de PCR en temps réel (Opticon2, BioRad), et la méthode de quantification absolue en utilisant un plasmide comme étalon interne a été choisie.

La figure VI-2 montre des exemples de mises au point concernant la GAPDH et l'aromatase. Les plasmides comportant les fragments de produits de PCR servent d'étalon

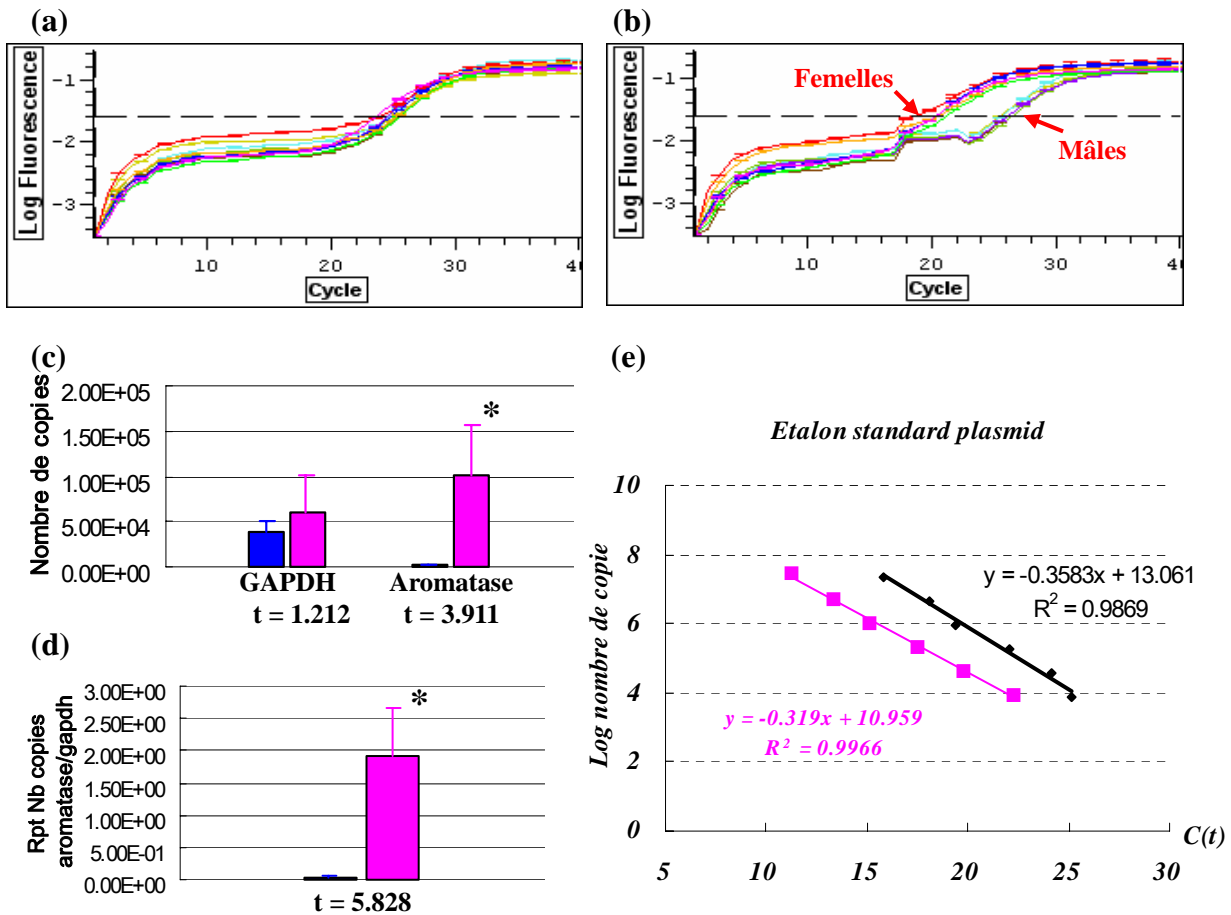


Figure VI-3. Quantification de l'expression de l'aromatase chez les larves ZZ²⁰ et ZW²⁰ au stade 54^{30d}. Les amplifications réalisées avec des amorces ciblant la GAPDH (a) ou l'aromatase (b) sont montrées pour différents échantillons. (c) Histogramme des données de quantification absolue, avec les résultats du test t de Student. * Différence significative à p<0,05 et seuil bilatéral à p<0,05 = 2,306. (d) Histogramme d'expression normalisée de l'aromatase, avec les résultats du test t de Student. * Différence significative à p<0,05 et seuil bilatéral à p<0,05 = 2,306. (e) Comparaison de l'efficacité de la réaction PCR entre GAPDH et aromatase.

interne lors de la quantification absolue. Le nombre de copies des plasmides a été calculé par rapport à leur taille. Les plasmides sont ensuite dilués de façon à obtenir une gamme entre 1×10^2 et 1×10^7 copies. La quantification est réalisée par l'émission de fluorescence de SYBR Green lors de l'étape de l'élongation de PCR.

Les courbes d'amplification de PCR concernant la GAPDH et l'aromatase au cours du temps montrent bien qu'il n'y a pas d'erreurs qui se produisent lors des dilutions de plasmides, puisque l'écart de C(t) (Cycle of threshold) entre chaque dilution est le même (Fig. VI-2a et VI-2b), ce qui est confirmé par l'équation de log (quantité de matrice) par rapport au C(t). L'efficacité de la PCR se calcule par rapport à la pente de l'équation, qui est : E (efficacité) = $10^{-\text{pente}} - 1$. D'après les calculs, nous avons 111% pour la PCR GAPDH et 108,4% pour l'aromatase. Les courbes de fusion réalisées à la fin des 40 cycles de PCR montrent que la température d'hybridation de l'amplicon est de 83°C pour la GAPDH et 79°C pour l'aromatase (Fig. VI-2c et VI-2d). La présence d'un seul pic indique qu'il n'y a que l'amplicon principal qui est amplifié pendant la PCR et qu'il n'y a pas de dimérisation entre les deux amorces. Les vérifications de contaminations ont été réalisées avec des échantillons d'ARN non rétro-transcrits et des essais en absence de matrice (figure non montrée).

Une analyse de l'expression de l'aromatase chez les larves ZZ²⁰ et ZW²⁰ au stade 54^{30d} a été réalisée par la méthode de quantification absolue. 5 échantillons de chaque groupe ont été utilisés (Fig. VI-3). Les cDNA sont dilués 125 fois pour réaliser les PCR de GAPDH. La figure VI-3a montre que la moyenne des C(t) est 25 pour les échantillons mâles et 24,6 pour les femelles, ce qui représente environ $3,97 \times 10^4$ copies pour les échantillons mâles et $7,63 \times 10^4$ pour les femelles. Par contre un écart important est constaté avec le profil de PCR de l'aromatase entre les échantillons mâles et femelles (Fig. VI-3b). Pour les PCR aromatase, les cDNA sont dilués 5 fois, et la moyenne des C(t) est 26 pour les échantillons mâles et 20,3 pour les femelles, ce qui représente $1,39 \times 10^3$ copies pour les échantillons mâles et 1×10^5 pour les femelles. La figure VI-3c présente les quantifications absolues sous forme d'histogramme. Nous avons constaté que le nombre de messagers aromatase est 139 fois plus élevé chez les

larves ZW²⁰ que les ZZ²⁰ (différence significative par le test t de Student à $p \leq 0,05$). En revanche aucune différence n'est observée pour l'expression de la GAPDH, et une normalisation de l'expression de l'aromatase par rapport à celle de la GAPDH a été aussi réalisée. La figure VI-3d montre que l'expression de l'aromatase est 50 fois plus élevée chez les larves ZW²⁰ que chez les larves ZZ²⁰. La figure VI-3e montre que les efficacités des PCR GAPDH et aromatase sont égales.

Par cette technique, la différence d'expression transcriptionnelle observée entre mâles et femelles est environ 20 fois plus importante que celle mesurée par la technique de PCR semi-quantitative. Cette différence d'expression correspond mieux à celle qui est mesurée pour l'activité enzymatique (voir plus haut). Le résultat obtenu par cette technique permet d'affiner notre hypothèse concernant la régulation de l'expression de l'aromatase chez le pleurodèle (Kuntz et *al.*, 2003) et rend plus vraisemblable un contrôle au niveau transcriptionnel.

Le protocole que nous avons établi est le suivant :

Les amorces pour la PCR en temps réel ont été choisies grâce à l'utilisation du logiciel Primer 3 (http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi) selon les critères suivants : taille de l'amplicon entre 75 et 150pb, contenu en G-C de 30 à 70%, température d'hybridation est $> 50^{\circ}\text{C}$ et optimal à 60°C . Les possibilités de structure secondaire, de dimérisation des amorces ainsi que la spécificité des amorces ont été vérifiées. Le mélange de PCR a été fait pour un volume final de réaction de 15 μl : cDNA 3 μl , amorce 1 1,5 μl 3 μM , amorce 2 1,5 μl 3 μM , H₂O 1,5 μl et SYBR Green Supermix (BioRad) 7,5 μl .

Les conditions de PCR en deux étapes sont déterminées dans un premier temps avec un essai de gradient de température d'hybridation comportant 40 cycles d'amplification, afin de s'assurer qu'il n'y a pas de phénomène de dimérisation entre les amorces et de contamination quelconque. Une gamme étalon interne réalisée avec des plasmides contenant les séquences des gènes analysés, de l'ordre de 10^2 à 10^7 copies, est ensuite utilisée comme matrice pour

tester l'efficacité de PCR. Une série de dilutions de cDNA est réalisée pour chaque gène afin de déterminer le facteur de dilution lors de l'analyse.

Les PCR de l'aromatase et de la GAPDH sont réalisées à une température d'hybridation de 65°C ; et celles d'AR et d'ER α à 67°C. Les échantillons à comparer sont dilués de la même façon pour réaliser les PCR, et les quantités de transcrits réels sont mesurées directement par rapport à l'étalon plasmidique ; les données sont exprimées en nombre de copies. Une normalisation par rapport aux transcrits de la GAPDH est réalisée et la différence d'expression est soumise à l'analyse statistique (test ANOVA) par le logiciel SPSS 10.0.

- Production des protéines recombinantes et d'immun-sérums

L'analyse de l'expression des récepteurs des oestrogènes et des androgènes a été aussi réalisée au niveau protéique. Les analyses envisagées étaient le western blot, l'immunohistochimie et l'immunoprécipitation. Les anticorps dirigés contre les protéines humaines, au moins l'ER α se sont avérés inutilisables sur les échantillons de pleurodèle. De fait, nous avons dû obtenir des anticorps dirigés contre les récepteurs de pleurodèle. Nous avons choisi de produire les protéines recombinantes et de les utiliser comme antigènes pour immuniser des lapins.

Les peptides d'environ 5 KDa, correspondant à différentes zones spécifiques des récepteurs stéroïdiens de pleurodèle, sont injectés à des lapins afin de produire les anticorps polyclonaux. Trois peptides (ER I, ER II et ER III) de 50 acides aminés, situés au niveau N-terminal, et correspondant aux débuts d'isoformes potentielles du récepteur des oestrogènes, ont été produits. De la même manière, deux autres peptides situés au niveau C-terminal du récepteur des oestrogènes (ER IV) et du récepteur des androgènes (AR), ont été produits.

Voici une description du protocole que nous avons utilisé :

Production des protéines recombinantes et Immunisation des lapins

Le cDNA est amplifié par PCR avec les amorces antiAR ou antiER α en incluant des

sites de restriction BamHI en 5' et HindIII en 3'. Les produits de PCR sont dans un premier temps clonés dans le plasmide pCR2.1 (Invitrogen). Les inserts sont ensuite excisés par une double digestion BamHI-HindIII (Fermentas), puis clonés dans le plasmide pTST101 préalablement linéarisé avec la même digestion. Ce plasmide permet la production d'une protéine de fusion comprenant le peptide d'intérêt associé à la « Maltose Binding Protein » (MBP). Une fois la séquence des clones vérifiée, les plasmides pTST101-anti-récepteurs sont transférés dans la souche *E. coli* DH5 α afin de réaliser la production des peptides.

L'expression des peptides est induite en culture liquide par l'ajout de 0,2% de rhamnose (Fluka). Trois cultures témoins sont aussi effectuées en même temps : le plasmide pTST101 original non-induit et/ou induit, et les plasmides pTST101-anti-récepteurs non-induits par le rhamnose. Les protéines issues des cultures bactériennes sont analysées sur gel d'acrylamide. Dans la culture témoin pTST101 induite, une protéine de fusion MaleE (Maltose Binding Protein : MBP)-eGFP de 70KDa est produite ; alors que les peptides anti-récepteurs fusionnés avec la protéine MaleE donnent des protéines de 48 à 50 KDa environ.

Les différents peptides envisagés ont pu être ainsi obtenus, à l'exception du peptide ER II pour lequel une dégradation de la protéine recombinante est observée au moment de la production, malgré l'utilisation de différentes souches bactériennes. Une fois les conditions optimales d'induction établies, les cultures en grand volume sont mises en oeuvre.

L'extraction fractionnée des protéines bactériennes est réalisée pour récupérer la fraction précipitée avec 60% de sulfate d'ammonium, où sont présentes les protéines de fusion. Une purification des protéines de fusion comportant la MBP est ensuite réalisée sur résine de maltose (BioLabs, new england).

Pour cela, les protéines sont reprises dans du tampon Tris-HCl 0,2M pH7,4 (tampon tris), puis 1mg est mis en contact avec 500 μ l de résine à 4°C pendant 2h. Après lavage avec le tampon tris, les résines couplées sont mises dans une colonne, puis les protéines de fusion sont éluées avec le tampon tris contenant 10mM de maltose. Après vérification sur gel d'acrylamide, 1 μ l de protéines purifiées est utilisé pour le dosage de protéines (Bio-Rad

Laboratory). Deux milligrammes de peptides repris dans 0.5% SDS sont chauffés et utilisés pour immuniser les lapins (souche néo-zélandaise) en présence d'adjuvant de Freund.

Traitements des immun-sérums

Les immun-sérums sont d'abord filtrés sur un filtre 0,22 μ m (MILLEX GP, Millipore). Les immun-sérums filtrés sont ensuite dilués avec 1 volume d'acétate de sodium (60mM pH4), puis 195 μ l d'acide octanoïque sont ajoutés. Cela permet la précipitation des protéines, hormis les IgG, sous agitation à température ambiante pendant une demi-heure. Le mélange est centrifugé à 6000rpm pendant 10 minutes, puis le surnageant est récupéré et dialysé contre du PBS1X (Sigma) à 4°C pendant 2 heures. Un dosage des IgG récupérées est réalisé, puis ces IgG sont conservées à -20°C en présence d'une concentration finale de 40% de glycérol.

Immuno-empreinte

Les tissus de pleurodèle sont broyés et les protéines totales sont extraites dans le tampon de lyse (contenant 25mM MOPS pH7,2, 60mM β -glycérophosphate, 15mM nitrophénylphosphate, 15mM EGTA, 15mM MgCl₂, 2mM DTT, 1mM orthovanadate de sodium, 1mM NaF, 1mM di-sodium-phénylphosphate et des inhibiteurs de protéases). Les surnageants sont récupérés après une centrifugation à 4°C, et 1 μ l d'extraits est utilisé pour le dosage des protéines (Bio-Rad Laboratory).

Les protéines totales sont dénaturées en présence de solution de Laemmli (contenant 50mM Tris-HCl pH6,8, 5% SDS, 10% glycérol et 2% β -mercaptoéthanol) pendant 5 minutes à 100°C, puis 50 μ g sont déposés sur un gel d'acrylamide à 12%. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham, Orsay, France). Les membranes sont saturées avec du tampon TNT (Tris-HCl, NaCl, Tween 20, pH 7,4) contenant 5% de lait écrémé à température ambiante pendant 2h, puis incubées avec les anticorps dilués à façon dans le même tampon à 4°C pour la nuit. Après 3 lavages avec du tampon TBST, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire lié à la peroxydase (Santa Cruz, CA)

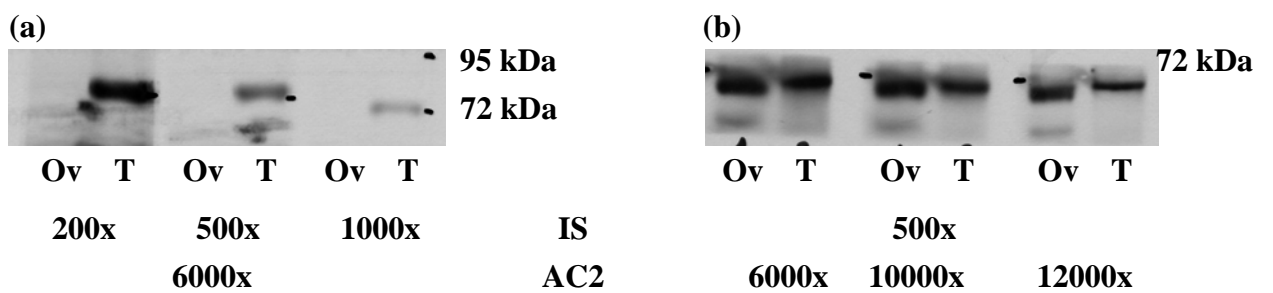


Figure VI-4 Mise au point des immuno-empreintes sur lysats de tissus adultes en utilisant les immun-sérums anti-AR (a) et anti-ER α (b). Ov – ovaire ; T – testicule. Les dilutions des anticorps primaires sont indiquées au premier rang, celles de l'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin) sont indiquées au deuxième rang. IS – immun-sérum, AC2 – anticorps secondaire.

pendant 1h à température ambiante. Les membranes sont ensuite lavées avec du tampon TBST, puis les signaux sont révélés en utilisant la technique de chimioluminescence (ECL Amersham).

La figure VI-4 présente les différentes conditions utilisées pour les anticorps ER IV et AR.

VI.2.3 Clonage d'ER α et analyse de son expression au cours de la différenciation gonadique

Les oestrogènes jouent un rôle essentiel dans la différenciation ovarienne chez les vertébrés ovipares. Chez le pleurodèle, l'importance des oestrogènes et de l'aromatase dans la différenciation ovarienne a été clairement prouvée (Kuntz *et al.* 2003a; Kuntz *et al.* 2003b). La différenciation sexuelle chez le pleurodèle est aussi sensible à des perturbateurs endocriniens, comme le EE₂. L'augmentation d'activité aromatase chez les larves femelles ne se produit qu'à la fin de la période thermosensible et de nombreuses questions sur l'action des oestrogènes restent sans réponse. L'expression des récepteurs de ces hormones a-t-elle lieu dans les gonades des deux sexes ? Comment les régulateurs des oestrogènes se comportent-ils lors d'inversions sexuelles induites par la température ? Quelles sont les cibles des oestrogènes ? Pour répondre à ces questions, nous avons étudié l'expression des récepteurs des oestrogènes.

Female-enriched expression of ERalpha during gonad differentiation of the urodele amphibian Pleurodeles waltl. Ko Chia-I, Chesnel Amand, Mazerbourg Sabine, Kuntz Sandra, Flament Stéphane, Chardard Dominique. Gen Comp Endocrinol. 2008 156(2):234-45.

Dans un premier temps, nous avons cloné le cDNA et un fragment du promoteur d'ER α de pleurodèle.

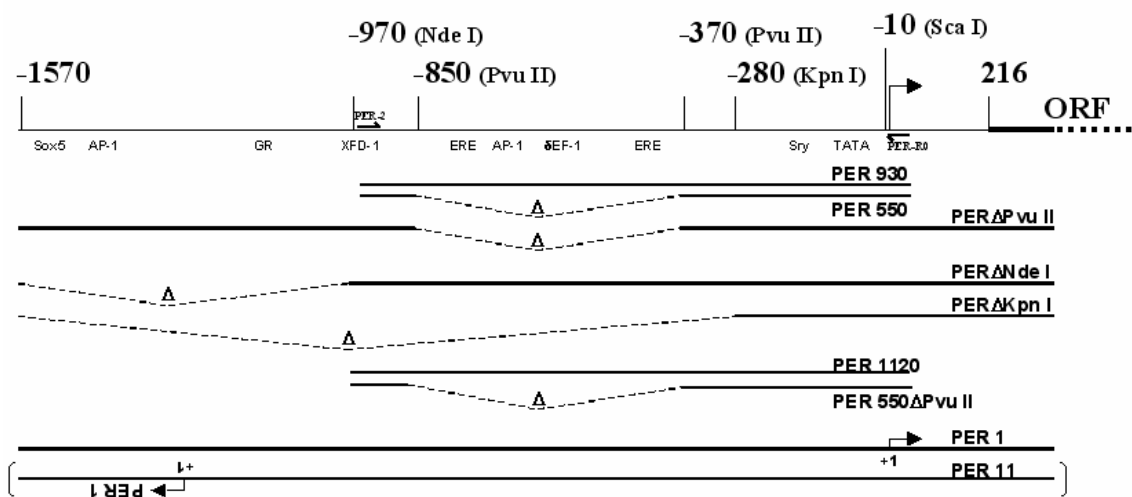


Figure VI-5. Différentes constructions issues de fragment promoteur d'ER α de pleurodèle. Certains sites d'élément de réponse sont indiqués. Les positions de repère de construction sont marquées par les sites de restriction et des amorces de PCR. Δ – délétion.

Le cDNA d'ER α obtenue contient une ORF de 1749pb, un fragment 5'UTR et un fragment 3'UTR qui contient plusieurs sites de poly-adénylation. D'après les comparaisons de la séquence d'acides aminés avec les autres espèces, ER α de pleurodèle présente 81,3% d'identité avec la séquence de xénope, 74,9% avec celle du caïman, 73,2% avec celle du poulet et 67% avec celle des mammifères. L'arbre phylogénétique de séquences d'ER α et d'ER β de différents vertébrés montre que la séquence isolée chez le pleurodèle est bien ER α . Malgré de nombreux essais, nos tentatives de clonage d'ER β sont restées vaines.

Un fragment 5' flanquant d'ER α de 1786pb a été obtenu par PCR sur l'ADN génomique extrait du foie d'un pleurodèle ZW adulte à partir d'une amorce spécifique située dans l'extrémité 5' de l'ORF (ER5R3). Ce fragment contient 1528pb de région promotrice, 215pb de 5'UTR et 43pb de séquence codante d'ER α . L'analyse informatique de la région promotrice montre des sites consensus de liaison pour les facteurs suivants : SOX5, AP-1, GR, Oct1, Forkhead, Wt1, ERE et SRY. Un test de fonctionnalité de cette région a ensuite été effectué en utilisant le vecteur pGL3 transfecté dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Une activité promotrice plus élevée est observée dans les cellules transfectées avec un plasmide comportant le fragment de 1786bp (pER1, Fig. VI-5) par rapport à la construction où le fragment est inversé (pER11, Fig. VI-5) et par rapport au vecteur témoin pGL3-basic.

L'expression d'ARN messager d'ER α a ensuite été étudiée dans différents tissus adultes de mâles et de femelles. Cette expression est localisée dans les organes reproducteurs : le testicule, l'ovaire, le tissu adipeux associé aux gonades, l'oviducte, ainsi que dans le foie où se produit la synthèse oestrogéno-dépendante de la vitellogénine. Une faible expression est également observée dans l'intestin.

L'analyse d'expression a été poursuivie dans les gonades pendant la période de différenciation du sexe. L'expression a été comparée entre larves mâles (ZZ²⁰) et larves femelles (ZW²⁰) dans les conditions d'élevage standard, et lors de la masculinisation induite par la température (ZW³²). L'expression de l'aromatase a été analysée simultanément comme

marqueur de la différenciation ovarienne.

Les analyses par PCR en temps réel pendant la différenciation sexuelle montrent que, aux stades 54 et 54^{15d}, l'expression d'ER α reste à un niveau basal aussi bien chez les mâles que chez les femelles, alors que l'augmentation de l'expression de l'aromatase a déjà débuté chez les femelles. L'expression augmente ensuite dans les deux sexes au stade 54^{30d} et devient plus importante chez les femelles que chez les mâles : ce stade correspond à un moment où l'ovaire est en cours de la différenciation. Les études réalisées par hybridation *in toto* confirment l'expression plus importante dans les gonades des larves femelles au stade 54^{30d}. Une expression est aussi détectée dans le tissu adipeux. A l'instar de ce qui est observé pour l'aromatase, la température semble inhiber l'expression d'ER α puisque aux stades 54, 54^{15d} et 54^{30d}, les taux de messagers sont plus faibles dans les gonades des larves ZW élevées à 32°C. Il est à noter qu'une expression d'ER α est aussi observée dans le mésonéphros, mais aucune différence significative entre les sexes n'est observée.

Female-enriched expression of ER α during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*

Chia-I Ko, Amand Chesnel, Sabine Mazerbourg, Sandra Kuntz, Stéphane Flament*, Dominique Chardard

Nancy-Université, Faculté des Sciences, EA3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

Received 6 November 2007; revised 9 January 2008; accepted 16 January 2008
Available online 26 January 2008

Abstract

In the amphibian *Pleurodeles waltl*, estradiol treatment of genetically male larvae (ZZ) induces male-to-female sex reversal whereas heat treatment of genetically female larvae (ZW) inhibits estradiol synthesis and leads to female-to-male sex reversal. No data are available on estrogen receptors in this species. In the present study, we have isolated a unique full-length *pWER α* cDNA and its 5'-flanking region whose promoter activity was confirmed by transfection assays. RT-PCR studies performed in adult animals using ER α -specific primers, revealed that *pWER α* mRNA was present mainly in reproductive tissues: gonads, fat body and oviduct. *PWER α* transcript was also detected in liver, suggesting its implication in vitellogenesis control as in numerous oviparous species. The level of *pWER α* transcripts was also studied during gonad differentiation by quantitative real-time PCR. At stage 54^{30d} *pWER α* expression in gonads of ZW larvae was significantly higher than in ZZ ones. This sex-specific discrimination was confirmed when gonad–mesonephros–interrenal complexes (GMI), taken at the same stage, were subjected to whole mount *in situ* hybridization. In comparison, the female-enriched expression of P450 aromatase, which was studied as a control of ovary differentiation, was observed earlier (stage 54). In ZW larvae reared at 32 °C, a condition leading to sex reversal, *pWER α* mRNA level at stage 54^{30d} was lower than in control females. Taken together, these results showing a female-enriched and thermosensitive expression of *pWER α* suggest an important role for this receptor in gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Sex differentiation; Amphibian; Estrogen receptor; Aromatase

1. Introduction

Estrogens are known to regulate cell functions such as growth and differentiation in target tissues, especially in reproductive organs. These steroid hormones have been demonstrated to promote ovary differentiation in non mammalian vertebrates (Guiguen et al., 1999; Kuntz et al., 2003a; Pieau and Dorizzi, 2004; Smith and Sinclair, 2004). This has been clearly illustrated in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (the Iberian ribbed newt). This member of the salamandridae family shows a ZZ/ZW

genetic mode of sex determination in which the W chromosome induces a female differentiation. The gonadal differentiation of *Pleurodeles waltl* is sensitive to the environment: rearing of genetic female larvae (ZW) at a temperature of 32 °C during the so-called thermo-sensitive period (TSP) induces a complete sex reversal into functional neo-males (Dournon and Houillon, 1985). During female gonad development, the activity of the estrogen synthesizing enzyme aromatase increases whereas its activity remains at a very low level in male gonad (Chardard et al., 1995). The increase in aromatase activity is not observed in gonads of ZW larvae reared at 32 °C (sex reversing condition). Similarly, when estrogen production is impaired by a treatment with an aromatase inhibitor, a

* Corresponding author. Fax: +33 (0)3 83 68 41 96.

E-mail address: stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr (S. Flament).

female to male sex reversal is observed (Chardard and Dournon, 1999). The importance of steroid hormones during the sex differentiation process is also illustrated by the results of treatments with exogenous steroids. Rearing *Pleurodeles waltl* ZZ larvae in the presence of estradiol or testosterone induces a male to female sex reversal (Gallien, 1951; Kuntz et al., 2003a). Conversely, a female to male sex reversal can be obtained by using non-aromatisable androgens such as dihydrotestosterone (DHT) (Chardard et al., 2003).

Sex steroids signal *via* receptors belonging to a superfamily of nuclear transcription factors containing common structural elements (Whitfield et al., 1999). These include a central DNA binding domain (C domain), a ligand binding region in COOH terminal (E domain) and two transactivation domains, AF1 located in A/B domain and AF2 located in E/F domain. Binding of a ligand to the receptor initiates a cascade of events leading to: (1) strong dimerisation, (2) increased nuclear localisation, (3) binding to specific sites (ERE) in the regulatory regions of target genes, and (4) effect on gene transcription (mediated *via* AF1 and AF2 domains).

Three distinct subtypes of estrogen receptors (ER) have been isolated, to date, in vertebrates. Teleostean fishes have ER α , ER β and ER γ (Hawkins et al., 2000; Sabo-Attwood et al., 2004; Halm et al., 2004; Filby and Tyler, 2005). However, ER γ (also named ER β 2) appears closely related to ER β , suggesting it reflects a recent gene duplication (Hawkins et al., 2000; Halm et al., 2004; Filby and Tyler, 2005). So, the ancestral condition for vertebrates seems to have been the presence of two types: ER α and ER β . Indeed, these two subtypes of ER have been found in reptiles (Katsu et al., 2004), in several birds (Foidart et al., 1999; Bernard et al., 1999) and mammals (Kuiper et al., 1997). In anuran amphibians, only two species have been studied up to now: ER α and ER β have been cloned in *Xenopus tropicalis* (Takase and Iguchi, 2007) while in *Xenopus laevis*, a pseudotetraploid species, a duplicated ER α gene has been found (Wu et al., 2003). In the urodele amphibian Japanese giant salamander, an ER α was also recently described (Katsu et al., 2006). In mammals, ER α is expressed in ovary, uterus, oviduct, mammary gland, testis, prostate, epididymis, pituitary, heart and arteries whereas ER β is present in ovary, prostate, epididymis and hypothalamus only (Couse et al., 1997). Mammalian tissue-specific expression was demonstrated to be correlated with the use of multiple promoters, especially in mouse, rat and human (reviewed in Grandien et al., 1995; Kos et al., 2001; Brand et al., 2002). This was also the case in other vertebrates such as in chicken (Griffin et al., 1998) and rainbow trout (Pakdel et al., 2000; Menuet et al., 2001). In *Xenopus laevis*, ER α 1 and ER α 2 isoforms are expressed in forebrain and oviduct whereas only ER α 2 is found in laryngeal muscle (Wu et al., 2003). This work shows that tissue-specific expression of both *x*/ER α 1 and *x*/ER α 2 splice variants can be explained by exon skipping rather than alternative promoter usage.

Although the importance of estrogens for sex differentiation in *Pleurodeles waltl* is definitely established, no study has been performed on ER in that species. We have isolated the *p*wER α cDNA, as well as its promoter. We have also analyzed ER α expression in adult tissues and during larval development. Our results show a female-enriched and thermosensitive gonadal expression of *p*wER α that could play an important role in sex differentiation and temperature-induced sex reversal.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Pleurodeles larvae were reared in tap water in our laboratory. All experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines (Comité régional d'éthique Nancy-Lorraine). The ZW or ZZ sexual genotype was determined by electrophoresis patterning of the two (W- and/or Z-linked) peptidase-1 isoforms, as described previously (Chardard et al., 1995). Developmental stages were determined by macroscopic observation according to Gallien and Durocher (1957). Since stage 55 lasts about 2 months we did not refer to it but instead, stage 54 was chronologically subdivided into stage 54 + 15 days (54^{15d}), stage 54 + 30 days (54^{30d}) and stage 54 + 60 days (54^{60d}).

The thermo-sensitive period (TSP) from stage 42–54 is defined as the developmental window, during which ZW larvae have to be reared at 32 °C in order to obtain 100% sex reversal (Dournon and Houillon, 1985). Heat treatment of ZW larvae was run at 32 °C (ZW³²) during the TSP while other ZW or ZZ larvae were maintained at 20 ± 2 °C as controls. A benzocaine solution (Sigma–Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) diluted in water at 0.03% was used to anesthetize animals before dissection.

2.2. ER α cDNA and 5'-flanking region isolation

Ovary cDNA was PCR-amplified with degenerated primers ER1 and ER2 (Table 1). The amplification was performed with 1 unit of Advantage II Taq DNA polymerase Mix (Clontech, St-Germain-en-Laye, France) in PCR buffer containing 200 μ M dNTP and 200 nM of each primer. Touch-down PCR program was 5 min at 94 °C, 20 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1.5 min, during which hybridization temperature was lowered from 60 to 40 °C. Amplification was then pursued with 35 cycles at 94 °C for 30 s, 40 °C for 30 s and 72 °C for 1.5 min. A cDNA fragment of 918 bp was purified with QiaEX II kit (Qiagen, Courtabouef, France) after gel agarose electrophoresis, inserted into the plasmid pGEM-Teasy (Promega, Charbonnières-les Bains, France) and transformed in *E. coli* Sure strain. After selection of positive clones, plasmids were extracted with alkaline lysis method and sequenced (Cogenics Genome Express, Meylan, France).

The 3'- and 5' cDNA-ends of ER α were amplified by using the rapid amplification of cDNA ends (RACE) strategy (SMART RACE cDNA Amplification kit, Clontech, CA). The 3' cDNA was synthesized from 3 μ g ZW larvae gonad-mesonephros-interrenal organ complexes (GMI) total RNA, and 5' cDNA from 3 μ g juvenile testis total RNA according to manufacturer's instruction. The 3' and 5' primary PCR were performed with specific primer ER3R and ER5R (Table 1), respectively, and a universal primer supplied in the kit. A three step PCR amplification was performed according to the following steps: 5 cycles at 94 °C for 30 s and 72 °C for 3 min; 5 cycles at 94 °C for 30 s, 70 °C for 30 s and 72 °C for 3 min; and 35 cycles at 94 °C 30 s, 68 °C 30 s and 72 °C 3 min. Nested PCR was performed with specific primer ER3R2 and ER5R2 (Table 1), and the universal primer supplied in kit. A 35 cycles PCR program of 94 °C for 30 s, 68 °C for 30 s and 72 °C for 2 min was executed, and two fragments of 822 bp (3' region) and 974 bp (5' region) were recovered (QiaEX II kit, Qiagen) after

Table 1
List of the PCR primers

Gene	Primer name	Primer sequence 5'–3'
pwER α	ER1	5'-GGDCAYAAAYGAYTAYATGTG-3'
	ER2	5'-TCCATKCCYTRTRTCTCAT-3'
	ER3R	5'-TCCAGCACCTGGAATCCCCAGAAGAG-3'
	ER3R2	5'-ATGGCAAAGTCTGGCCTCTCGCTGCAG-3'
	ER5R	5'-AAGGG AGGGGCTTCTGCGCTCTGAGAC-3'
	ER5R2	5'-GCCAAGTCGACAGGCCTGGCAGC-3'
	ER5R3	5'-TGCCCCGTCTGCTGTTTCTCCACG-3'
	ER5R4	5'-GGTGAAGC AGGGCGACTCC-3'
	ERup2	5'-GAGCGCAGAAGCCCCCTCCCTT-3'
	ERdw	5'-TCGAGCTGCTGTGGCCACCAG-3'
	ERaq-dir2	5'-ATCCTTTCTCACATCAGGCACAT-3'
	ERaq-rev2	5'-TATTCGGTGGGCATCTAACATCT-3'
	PwP450 Aromatase	Aromq-dir2
Aromq-rev2		5'-ATTCCATTTTCATTCATGCCAAC-3'
PwGAPDH	Gapdh3	5'-ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3'
	Gapdh4	5'-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3'
	Gapdhq-dir2	5'-G AAGGTAGTAAGCAACGCCTCCT-3'
	Gapdgq-rev2	5'-CACAGCATGTACAGTGGTCATCA-3'

agarose gel electrophoresis. The 3' and 5' fragments isolated were inserted into the vector pGEM-T easy (Promega), transformed into *E. coli* strains, and then sequenced (Cogenics Genome Express).

The strategy of Universal Genome Walker kit (Clontech, CA) was used to isolate ER α 5'-flanking region. ZW genomic DNA was digested with different restriction enzymes that recognize a six bases site and leave blunt ends, and DNA fragments were ligated to the genome walker adaptor. The primary PCR was performed with the specific primer ER5R3 (Table 1) and the adaptor primer supplied in the kit. The PCR program was: 7 cycles at 94 °C for 25 s and 72 °C for 3 min; 32 cycles at 94 °C for 25 s and 67 °C for 3 min and 67 °C for 7 min. The nested PCR was performed with the specific ER5R4 primer (Table 1) and those supplied in the kit with the same program. The fragment of interest was recovered (QiaEX II kit, Qiagen) after agarose gel electrophoresis, inserted into the vector pGEM-T easy (Promega), transformed into *E. coli* SURE strain (Stratagen), and then sequenced (Cogenics Genome Express). By using one restriction site localised into the pGEM-T easy MCS and the other one into the ER- α 5' UTR, a ~1.5 Kbp SacI fragment was then inserted in direct (PER1-luc) or inverted (PER11-luc) orientation in the SacI restriction site of the pGL3-Basic vector (Promega).

2.3. Phylogenetic analysis

The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining algorithm implemented in the PHYLO_WIN program (Galtier et al., 1996).

Accession numbers of the ER α sequences included in the tree are: AAL12298 (*Carassius auratus* ER α), AAQ84780 (*Xenopus tropicalis* ER α), AAN63674 (*Coturnix japonica* ER α), ABW24738 (*Pleurodeles waltl* ER α), BAE45626 (*Crocodylus niloticus* ER α), AAG24543 (*Ictalurus punctatus* ER α), BAF91191 (*Pseudemys nelsoni* ER α), BAE79508 (*Eublepharis macularius* ER α), P19785 (*Mus musculus* ER α), NP001083086 (*Xenopus laevis* ER α), XP001371027 (*Monodelphis domestica* ER α), NP990514 (*Gallus gallus* ER α), BAF30926 (*Andrias japonicus* ER α), O08573 (*Mus musculus* ER β), O93511 (*Coturnix japonica* ER β), BAA88667 (*Gallus gallus* ER β), XP 001377837 (*Monodelphis domestica* ER β), BAE79509 (*Eublepharis macularius* ER β), BAE81789 (*Xenopus tropicalis* ER β), AAF63157 (*Ictalurus punctatus* ER β), AAD26921 (*Carassius auratus* ER β), AAK20929 (*Petromyzon marinus* ER).

2.4. Cell transfections

MCF-7 cells were grown in DMEM medium (Invitrogen) supplemented with 2 mM glutamine and 10% fetal calf serum. 120,000 cells

were seeded in 24-well plates and transfected for 4 h with 500 ng plasmidic DNA and 6 equivalents of EXGEN 500 (Fermentas, St-Rémy-les-Chevreuse, France) following the manufacturer's protocol. PER1-luc, PER11-luc or pGL3-Basic plasmids (300 ng) were co-transfected with pCMV- β Gal (50 ng) and DNA level was completed to 500 ng per transfection assay with empty pCDNA3 vector. After cell lysis (Glo lysis buffer, Promega), luciferase activity as well as β -galactosidase activity were measured and the results were expressed as the luciferase/ β -galactosidase ratio.

2.5. RT-PCR

RNA extraction was performed using TRIzol reagent (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA). For developmental mRNA expression analyses, samples were pooled from four animals at the same stage. In old larvae (from stage 54^{30d}) gonad (G) and mesonephros-interrenal organ (MI) were isolated separately whereas in young larvae (smaller in size) GMI was collected as a whole complex. For expression analyses in adults, total RNA was extracted from 50 to 100 mg of tissue. The concentration of RNA was measured by spectrophotometer, and different quantities of total RNA were reverse transcribed into cDNA. After 5 min RNA denaturation in 12.5 μ l reverse transcription (RT) buffer 1X (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), the RT was carried out at 37 °C for 2 h in a final volume of 25 μ l containing: 1.6 mM DTT, 0.6 μ g hexanucleotide (Random Primer, Invitrogen), 4 U RNase inhibitor (RNaseOUT, Invitrogen), 1 mM of each dNTP, RT buffer 1X and 100 U Mouse Moloney Leukemia Virus reverse transcriptase (MMLV-RT, Invitrogen).

Three micrograms of total RNA from ZZ and ZW adult organs were treated with 3 U of RQ1 RNase free DNase (Qiagen), and then reverse transcribed. After reaction, cDNA was diluted with 50 μ l water and 5 μ l cDNA were used for amplification. PCR was performed with 0.5 unit of *Taq* DNA polymerase (Eppendorf, Le Pecq, France) in PCR buffer containing 200 μ M dNTP, 1 mM MgSO₄, 0.5 \times *Taq* Master Mix (Eppendorf) and 400 nM of each primer in a final volume of 25 μ l. ER α specific primers ERup2 and ERdw (Table 1) were employed, which amplify a 441 bp length PCR product. This product encompasses one exon/intron boundary based on comparison with other vertebrate ER α genes organization. The PCR program began with 94 °C for 5 min, followed by 32 cycles at 94 °C 30 s and 68 °C 1 min, and 5 min at 68 °C. GAPDH was used as a control to ensure that RNA was not degraded or that transcription was efficient. Specific primers Gapdh3 and Gapdh4 (Table 1) were employed and a 290 bp PCR product was obtained.

2.6. Quantitative real-time PCR

cDNA transcribed from 1 µg of total RNA were diluted 3-, 15-, 375-fold before performing ER α , aromatase and GAPDH quantitative PCR, respectively. All PCR were realized with “Opticon 2 real time PCR detection system” (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) with a final volume of 15 µl. Primers were designed using software Primer 3 (http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi). For every gene analyzed, the cDNA fragment was inserted into a plasmid and dilutions containing plasmid copy numbers from 10⁴ to 10⁷, were used to establish the standard curve for absolute quantification.

For ER α , PCR was performed using 100 nM each of forward and reverse primer: ERAq-dir2 and ERAq-rev2 (Table 1), 7.5 µl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and 3 µl cDNA or plasmid dilution. The PCR program included enzyme activation at 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C 15 s and 67 °C 45 s. A similar procedure was realized for aromatase and GAPDH PCR, using 300 nM of forward and reverse primers (Aromq-dir2, Aromq-rev2, Gapdhq-dir2 and Gapdhq-rev2, Table 1) and 65 °C annealing. Cycle threshold (C_t) values obtained were converted into cDNA copy numbers using standard curve plots of C_t versus log copy number. Data obtained from duplicated runs for target cDNA amplification were averaged and expressed as copy number. Target gene expressions were normalized with GAPDH one, which presented a homogenous level among different samples.

Results were represented as means \pm standard error of several groups as indicated in the figure. Differences were tested using analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). When significant difference was detected, specific post-hoc comparisons between groups were examined using Bonferroni least-significant difference test (SPSS v12.0 computer software).

2.7. Whole mount *in situ* hybridization

A 291 bp ER α 3' region was inserted into pGEM-T easy (Promega) vector, which was used to generate digoxigenin (DIG) labeled RNA probes by *in vitro* transcription. *In vitro* transcription was performed at 37 °C for 3 h in transcription buffer containing 350 µM 11-UTP-DIG (Roche, Neuilly-sur-Seine, France), 650 µM UTP, 60 U of T7 or SP6 RNA polymerase (Fermentas, St-Rémy-les-Chevreuses, France) and 1 mM of ATP, CTP and GTP (Roche) in a final volume of 30 µl. RNA probes were precipitated by adding 0.5 M LiCl and then suspended in 50 µl DEPC treated water containing 40 U of RNasin (RNaseOUT Ribonuclease inhibitor, Invitrogen).

Larvae GMI were fixed 3 h at 4 °C in 2% paraformaldehyde (Sigma) prepared in 75 mM phosphate buffer. Tissues were dehydrated through a graded series of methanol and conserved in absolute methanol at -20 °C.

Samples were rehydrated through a decreasingly graded series of methanol, and then treated by 10 µg/ml proteinase K (Euromedex, Mundelsheim, France) at room temperature for 20 min. Proteinase K treatment was stopped by 0.2% glycine in PBS 1X, and samples were post-fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma) prepared in PBS 1X for 15 min. Samples were pre-hybridized in 1 ml hybridization buffer (containing 65% formamide (Fluka), SSC 5X, yeast tRNA 100 µg/ml, heparin 0.005% and Tween 20 (Sigma) 0.1%) at 70 °C for 1 h. Antisense and/or sense RNA probes were denatured at 95 °C for 5 min, diluted with hybridization buffer to 2 ng/µl and incubated with tissues at 70 °C overnight. The next day, 15 min and twice 40 min washes with formamide 65% and SSC 2X were performed at 70 °C, followed by 15 min and twice 40 min washes with SSC 2X and SSC 0.2X supplied with 1% Tween 20 at 65 °C. Before application of anti-DIG antibody, samples were saturated with blocking buffer (TBS 1X, BSA 0.5%, Tween 20 0.2% and Triton X-100 0.2%) at room temperature for 1 h. Alkaline phosphatase conjugated anti-DIG antibody (Fab fragment, Roche) was diluted to 150mU/ml in blocking buffer and applied to samples at 4 °C overnight. Washing was realized in TBS 1X supplied with 0.1% Tween 20 (Sigma) at room temperature. Phosphatase activity was then revealed with BM purple (Roche) at 4 °C overnight.

3. Results

3.1. *Pleurodeles waltl* ER α cDNA isolation

Pleurodeles waltl full length ER α cDNA (2471 bp, Accession No. EU169228, sequence not shown) was isolated from gonad (testis and ovary). First, a 918 bp fragment was obtained by degenerated PCR. It was located in the middle of the open reading frame (ORF). Then by using RACE PCR, a 5' region of 974 bp and a 3' region of 822 bp were isolated.

PwER α cDNA is composed of 1749 bp including an ATG start site that predicts an ORF encoding a protein of 582 amino acids (Fig. 1). Comparison of deduced amino acid sequence of *PwER α* with those of other vertebrates indicates that the *Pleurodeles* sequence is very similar to that of other amphibians: 90.2% identity to Japanese giant salamander (*urodele*) and 81.3% to *Xenopus laevis* (anuran). The sequence shows 74.9% of identity to caiman, 73.2% to chicken and 67% to mouse or human (Fig. 1).

Using the nomenclature of Krust et al. (1986), the *PwER α* sequence can be divided into five domains based on its sequence homology to other steroid hormone receptors. The seven ER α (*Pleurodeles waltl*, Japanese giant salamander, *Xenopus laevis*, caiman, chicken, mouse and human) sequences examined shared 56–87% identity in the A/B domain, 96–98% in the C domain (DNA binding domain), 54–86% in the D domain, 83–95% in the E domain (ligand binding domain) and 62–81% in the F domain.

A phylogenetic study was also performed using the PHYLO_WIN program (Galtier et al., 1996). A phylogenetic tree was constructed using numerous ER α and ER β proteins from various vertebrates (Fig. 2). The analysis showed that *PwER α* is similar to the Japanese giant salamander ER α , another urodele amphibian. A similarity to anuran ER α was also observed whereas the similarity with reptilian ER α was lower. *PwER α* was very different from ER β of other vertebrates.

3.2. Sequence of *Pleurodeles waltl* ER α 5'-flanking promoter region

A 1528 bp ER α 5'-flanking sequence was isolated from *Pleurodeles waltl* genomic DNA (Accession No. EU169229) (Fig. 3). Sequence analysis of the 5'-flanking region of *PwER α* revealed the presence of a putative TATA box at position -70 bp and several *cis*-acting binding sequences. We identified two estrogen receptor response element half-sites (-457/-453, -666/-661) with an AP1 site between them (-632/-622), which are known to bind estrogen receptor and its cofactor AP1. Other binding sites including SRY (-162/-158), Δ EF-1 (-556/-546), Forkhead (-928/-915), Oct-1 (-931/-920), glucocorticoid receptor (-1158/-1149), Sox-5 (-1464/-1454) and another AP1 site (-1439/-1431) were found. Interestingly, numerous clusters of heat shock factor response element (HSE) are identified along the isolated 5'-flanking fragment.

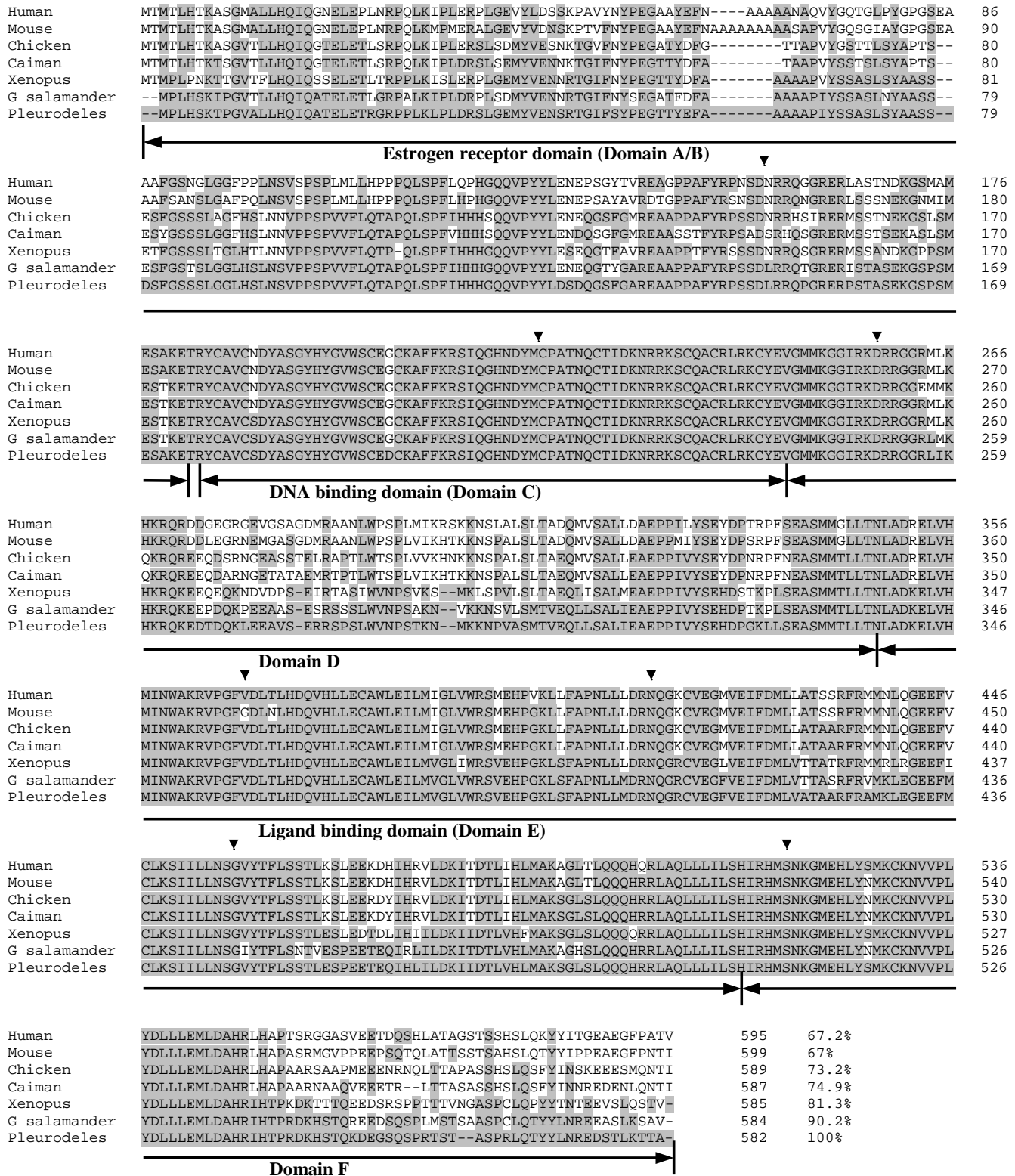


Fig. 1. Alignment of amino acid sequences of estrogen receptor alpha from several vertebrates. Amino acid identity with *Pleurodeles waltl* sequence (Accession No. EU169228) is emphasized in grey and indicated as percentage at the end of each sequence. Nuclear receptor A/B to F putative domains are indicated. Arrowheads show intron positions deduced from protein sequences comparison.

The activity of this ERα promoter fragment was examined by transient transfection assays in MCF-7 breast cancer cells (Fig. 4) that endogenously express ERα gene. ERα

5'-flanking sequence in both direct (PER1-luc) and inverted (PER11-luc) orientations was used to drive luciferase expression, and the native orientation allowed a 3-fold

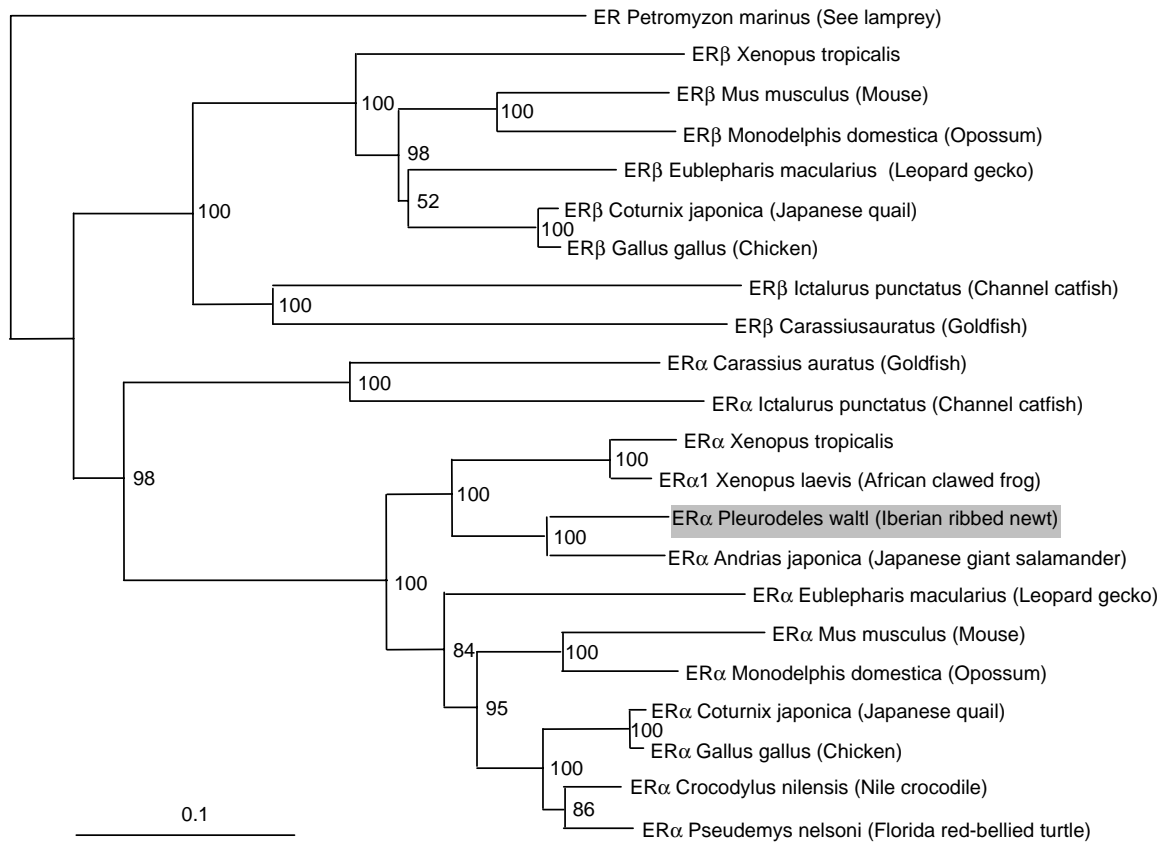


Fig. 2. Phylogenetic tree of vertebrate ER α and ER β . The phylogenetic tree was constructed using the PHYLO_WIN program, the neighbor-joining method and bootstrap re-sampling for 500 times. The number indicates the bootstrap value (%) and the length of branch reflects estimated numbers of substitutions along each branch. The scale bar indicates 0.1 EAASS (expected amino acid substitution per site).

increase of luciferase/ β -galactosidase ratio when compared to the control pGL3-Basic vector (Fig. 4). No significant change was observed with the PER11-luc inverted construction.

3.3. Tissue-specific expression in adults

Pleurodeles waltl ER α mRNA expression was examined by RT-PCR in various adult tissues (Fig. 5). ER α expression appears mainly in reproductive tissues: gonads, adipose tissue adjacent to gonad and oviduct. A high expression was also revealed in liver, and a low one in intestine.

3.4. ER α expression is correlated with ovary differentiation

The expression pattern of ER α mRNA during gonad differentiation was studied by whole mount *in situ* hybridization and quantitative real time PCR. P450 aromatase mRNA expression was studied simultaneously as a marker of ovary differentiation (Kuntz et al., 2003a).

Whole mount *in situ* hybridization analyses were performed with GMI complexes from ZZ and ZW larvae. At stage 54^{30d}, ER α was expressed at a higher level in gonads of ZW animals than in ZZ ones (Fig. 6a and b).

A faint staining was also detected in fat body and mesonephros. In comparison, aromatase expression was restricted to gonads, and the staining was higher in ZW larvae than in ZZ ones (Fig. 6d and e).

Quantitative real-time PCR analyses were performed with cDNA prepared either from GMI complexes at stages earlier than 54^{30d} or from isolated G and MI at stage 54^{30d}. We studied ZZ and ZW larvae as well as ZW larvae reared at 32 °C (ZW³²). At stages 54 and 54^{15d} no difference in GMI ER α expression was observed between ZZ and ZW animals (Fig. 7a). An ER α expression inhibition by temperature was revealed in ZW³² larvae since a lower expression was observed, merely this inhibition was only significant at stage 54. At stage 54^{30d} in gonad compartment, a 11.2-fold increase in ER α expression was observed in ZW animals versus ZZ ones (Fig. 7b). At this stage, an inhibitory effect of temperature was also observed for ER α expression: temperature induced a 1.9-fold decrease in ER α at this stage when compared to ZW gonads (Fig. 7b). ER α expression was also revealed in MI compartment, but no difference was observed among sexes and temperature did not seem to have significant effects.

At stage 54, GMI aromatase expression level was 3.9-fold higher in ZW animals than in ZZ (Fig. 7c). Aromatase expression increased during ovarian differentiation to reach

```

AGGTATACACATATGGTGTGA TAGTCATTTGTAGAGTGCAA GCCTTGCTATAAGCAACACT -1469
GCACTGAACAATAGCGGGGC CCCTGGCTTTATGATTCAGGA TTAATAAAGTAGCCTGTT -1409
      Sox5      STRE *      AP-1
CGTGGGTGCTAAACCAGAAG TTGTAAATGTCTCTCAAGAC GAGGGCCTTCAGTTCATTTC -1349
      *
TGGATTGGCGCAGTTCCTGAT GTTTACGGGGACGGTGTTC A GGGTTCTTGAAGACAGCTA -1289
      *
GAGAAAGTATCTCTTCTACT TTTTTTATTACCGATTTTT CTTTCCAGACTGGGGATTTTC -1229
      *
GAAATATAACTCTTGGATGA TTCCCGCTCTAGATACACA TGTGCGTCTCCTTCTGCCTT -1169
      *
CGTTGTCAATTATGTGTCCT CGAATAACTGTGGCTGATTA CTTGAACTATTCAGCATT A -1109
      GR
TTAGTAAATCTCTAAAAAATT CAGGAAACAACACCGAACAC AGGAGCAATTGTAAATGTAC -1049
      *
ACGTTTTTTACTTTGTAGAA TATGGTGTGCTAATCAGCA CTAGCATGAGTTACTTTTGTG -989
      *
GGTGTAATCGAATTTATAT TGACTGTCTAGAATCACTCT TTGGGTATTCTGTTTTTGCA -929
TATGTAAACATAGTGGGGGG GGGGGTTATAGCTGCCCTA CCTTGAACACTTTTCCATGC -869
Oct-1 XFD-1
TCCTCTACAATAAGGCCATG CATGAACAATCCCACGGAC CCAAGATACACACGCGCAG -809
      GATA 1      WT1
CTGAAAGTCATGCCCTAGTC TCAGACCTTATACAAATTCA TCAACCCTTTTTAATTTATG -749
      *
AACTACTGTCAATTTTGGCAG TCGAAATATATTTTTTATG GCTGCTTGCCTATTAGTGAT -689
      *
CAGAAAAAACCTTTTCGAA TCGGCTCAGAAGAGTGGAAAC ATTAAGAACTCAAACCACTG -629
      *      ERE *
ACTCAACTGAAGATTTGGA CCCATTGTATCCAAAAATG TTAGTAAATGAAAAACACGT -569
      AP-1
GACTTTGTGCTATTTAGGT ACTACCCTGTTCGCACCC ACACTGGCACCAGGCAACAC -509
      delta EF-1
GTGTCTCTGGTTCCGTGCCA CCTACATCAATGTAAGGCGG ACTTTCATATCTGACCCAGA -449
      *      ERE
CAGGACATTAGTGCCAGCTG CGTGTCTGTATGGGCAGGTA AATCTTCAGATTTCTTTCAT -389
      *
TGTGGATAGGAATATTGTCG GGAAATCACATGCATGAAAA TGATTCACAGAACAGCACCG -329
      *
AGCAGCAGCAAAAACCAGAG AGTCTGTGCGAGGTACCGACC ACTAAGTCCCCCTTCACCGT -269
      *
TCACACACCTCTGGCCCTC GAGGCCACCCCGAGCACCA CTGTGCTCCAGAGCGAAAAG -209
      *
TTAAGTAATCGACTCTTAAA GAGAAAAAATACAAAAGGA AAGAAAACAAAAGAACTAAG -149
      *      SRY *
AAAAAAGTGCATCTGGTGT TTCTCCAAAAGACCAGTCGA GCCTGAAGTGATGTTTAAAC -89
      *
CGGTGTCTGTGCACTATAAC AGCCCTGGACCCCGCCAG CACCTTTGTAATACACATTA -29
      TATA box      STRE *
TTAGCTGGGATGCAAAAGTAC TTAAAGTTAGAAGGGGTGAG GGAGGAAGTACAGCCCGTGC 32
      +1 *
TCTGTCTCACACCGCACTCC TCGTATCCTCCCTTGCCAG GAACAGACTGAATACCTGTG 92
      *
CGGCGCGATAGGAGTGCGT TTTCAGCGCAGCTCATGCC AGCGTGTGCTCTTCTTCCGG 152
      GATA-1, 2      SacI
CAGGTTCAACAAGTGCTGAG CCTCGCCAGCCATGCCGCT CGCCTGCCGCAATAGCCAG 212
      Forkhead box
AACATGCCCTCCACAGCAA GACGCCTGGAGTCGCCCTGC TTCACC 258
      *

```

Fig. 3. 5'-Flanking *Pleurodeles waltl* ER α nucleotide sequence (Accession No. EU169229). This sequence was studied by using "Transcription factor search" (TFSEARCH) or "Motif finder" (<http://motif.genome.jp>). Some of the putative regulating factors binding sites, whose homology with consensus is more than 90%, are boxed. The transcription initiation site as well as the start codon position are indicated in boldface. Potential Oct-1 binding site and the SacI restriction site used for subcloning are underlined. Heat shock factor putative binding sites as well as stress response elements (STRE) are indicated with an asterisk. GR, Glucocorticoid Receptor; XFD-1, Xenopus Forkhead Domain 1.

5.1-fold ZZ GMI level at stage 54^{15d} (Fig. 7c). At stage 54^{30d}, when gonads could be separated from MI complex, no aromatase expression was revealed in MI compartment. At stage 54^{30d}, the difference between ZW and ZZ gonadal aromatase expression reached 12.3-fold (Fig. 7d). A masculinizing effect of temperature was observed on aromatase expression from stage 54–54^{30d}. Indeed, expression in ZW³² larvae did not reveal any difference when compared to ZZ ones (Fig. 7c and d).

4. Discussion

Like in other non mammalian vertebrates, estrogens have been demonstrated to play a primordial role in *Pleurodeles waltl* sex differentiation (Kuntz et al., 2003a). How-

ever, while most studies have focused on aromatase and estrogen production, few data have been collected on steroid receptors during gonadal differentiation.

The ER α cDNA isolated from *Pleurodeles waltl* gonadal tissue contains a complete ORF encoding a protein of 582 amino acids. The 5'UTR is 215 bp long, that is similar to those observed in other species (Kos et al., 2001). Multiple alignments of ER protein sequences and a phylogenetic analysis strongly suggest that we have cloned an ER α ortholog since the sequence shows a high degree of homology to the ER α from other vertebrates (90.2% with Japanese giant salamander, 81.3% with xenopus, 67% with mammals). The highest percentage of identity was observed for the DNA binding domain and the ligand binding domain. Our attempts to clone other cDNAs were unsuccessful but the

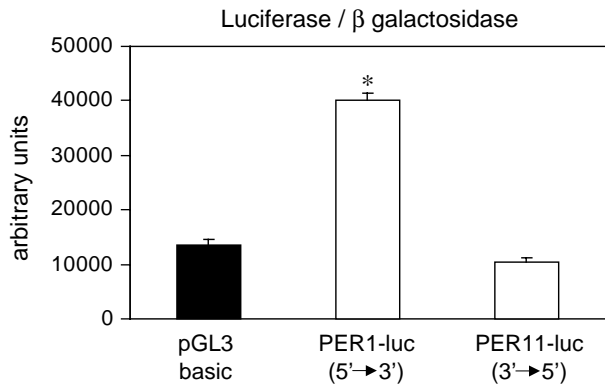


Fig. 4. Promoter activity of the ER- α 5'-flanking sequence in MCF-7 cells. ER- α 5'-flanking sequence was used in either direct (PER1-luc) or inverted (PER11-luc) orientation to drive pGL3 borne luciferase expression into MCF-7 cells (see Section 2 for details). The pGL3-basic plasmid stands for a negative control. Results are expressed as the Luciferase/ β -galactosidase (β -Gal) ratio. Shown are the means \pm SEM of triplicates. *Significantly different from negative control ($P < 0.05$).

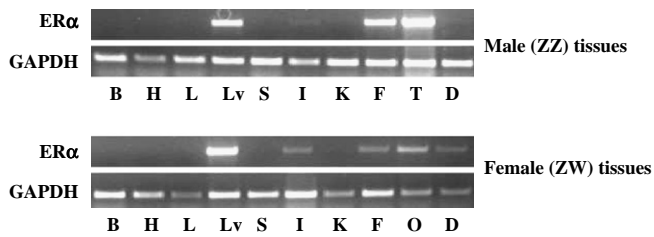


Fig. 5. Tissue-specific expression of ER α in adult *Pleurodeles waltl*. Total RNA was extracted from different adult tissues: brain (B), heart (H), lung (L), liver (Lv), spleen (S), intestine (I), kidney (K), fat body (adipose adjacent to the gonad) (F), testis (T), ovary (O) and spermiduct for male or oviduct for female (D). After the DNase treatment, samples were subjected to qualitative RT-PCR. GAPDH serves as a positive control.

presence in *Pleurodeles waltl* of other ER β or ER α isoforms, as observed in other vertebrates is very likely. For example, in chicken (Griffin et al., 1999) and rainbow trout (Pakdel et al., 2000) two ER α isoforms differing in their N-terminus length by usage of multiple promoters and upstream exons were identified. Such isoforms differ in their ability to regulate estrogen target gene expression in a promoter- and cell type-specific manner. In rainbow trout, full length ER α is expressed in reproductive organs while the truncated form is liver enriched (Menuet et al., 2004). In *Xenopus laevis*, two ER α genes exist, probably being retained after a genome duplication specific to the *Xenopus laevis* lineage: ER α 1 is expressed in liver, forebrain and reproductive organs while ER α 2 which lacks the N-terminus domain is expressed in laryngeal muscles in relation to the production of sexually differentiated songs. Alternatively spliced transcripts of both genes are also expressed in a tissue specific manner (Wu et al., 2003). In our study, to discriminate between ER α and ER β , primers specific of ER α were deduced from alignments of ER α and ER β sequences from different vertebrates. Nevertheless, one cannot exclude the existence of ER α isoforms and/or gene duplications.

Our RT-PCR analyses in adults reveal that ER α mRNA was present in ovary and testis, fat body associated to gonads, liver, oviduct and to a lesser extent in spermiduct and intestine. ER α expression in ovary and oviduct is correlated with the well known action of estrogens in female differentiation (Tiffoche et al., 1993; Kuntz et al., 2003b). The presence of transcripts in testis could be related to a role of estrogens in spermatogenesis as demonstrated in the newt *Triturus marmoratus* (Arenas et al., 2001) and in mammals (Carreau et al., 2002; Lambard and Carreau, 2005). In the Japanese giant salamander, ER α expression was not studied in males (Katsu et al., 2006). The hepatic ER α expression is consistent with estrogenic control of vitellogenesis (Wu et al., 2003; Lutz et al., 2005; Katsu et al., 2006). The absence of ER α transcripts in forebrain and lung is surprising. It could suggest the existence of another ER isoform in *Pleurodeles waltl*, since a P450 aromatase expression was observed in these organs (Kuntz et al., 2004a,b). In other vertebrates such as *Xenopus laevis* and rainbow trout, ER α transcripts are clearly detected in forebrain (Pakdel et al., 2000; Wu et al., 2003).

ER α expression was then studied in larvae, especially in gonad, fat body and mesonephros-interrenal. In parallel, we also studied aromatase expression as a marker of ovary differentiation. First, qualitative RT-PCR results showed that ER α expression begins early before gonad differentiation, from at least stage 48 in both sexes (data not shown). At stage 54^{30d}, whole mount *in situ* hybridization revealed that ER α was expressed at a high level in gonad and fat body, and at a lower level in MI. It is to notice that ER α mRNA were not found in adult kidney. In contrast, aromatase expression was strictly restricted to gonads as previously observed using other methods (Kuntz et al., 2003a). In gonads, ER α expression was higher in ovary than in testis. We never detected any difference in the staining intensity along the cephalo-caudal axis of the ovary.

At the beginning of gonadal differentiation, ER α expression was measured by quantitative real-time PCR and compared to aromatase profile. The present study performed using real-time PCR indicates a high difference in aromatase mRNA levels between males and females at stage 54^{30d} (12.3-fold). This is a higher value than previously obtained using semi-quantitative RT-PCR (Kuntz et al., 2003b). This is due to the higher sensitivity of real-time PCR. Our result is in good agreement with the difference in signal intensities observed by whole-mount *in situ* hybridization. At stage 54^{30d}, when mesonephros and gonads could be analyzed separately, no aromatase expression was found in mesonephros. For ER α expression, a sharp increase of transcripts number was also observed in gonads of female larvae but only at stage 54^{30d} (11.2-fold difference between males and females). At stage 54 and 54^{15d}, there was no difference between male and female larvae. However, as a low ER α mRNA level was equally detected in mesonephros of males and females, it may be that ER α expression in mesonephros masks subtle differences in gonads before stage 54^{30d}. Nevertheless, high

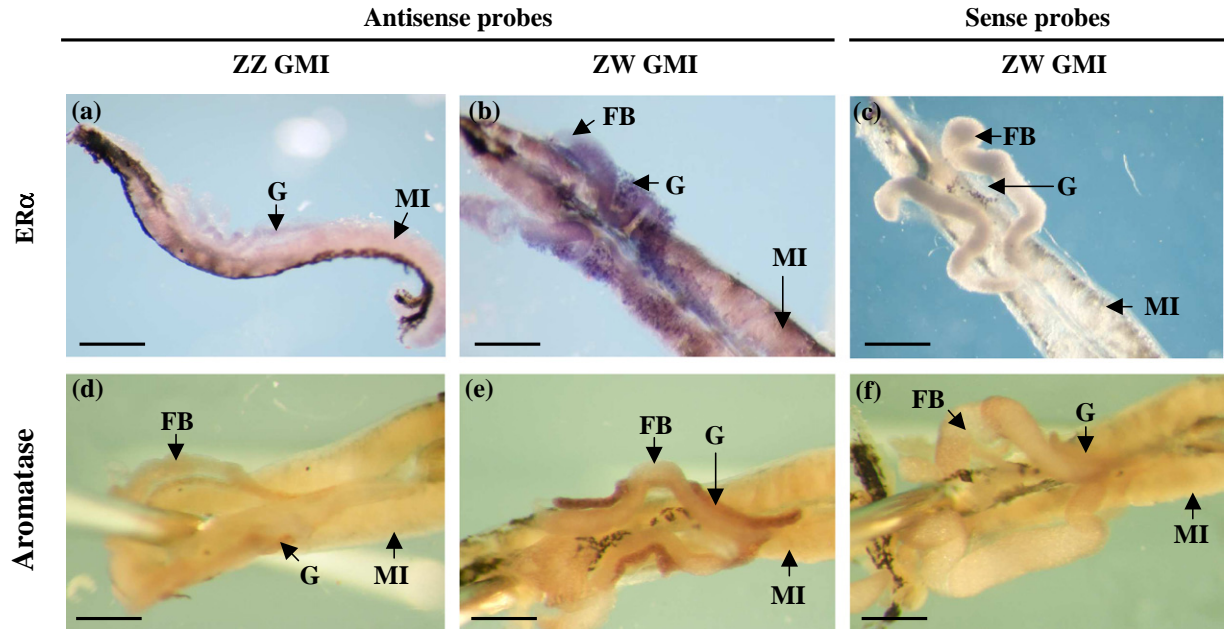


Fig. 6. Whole-mount *in situ* hybridization showing ER α (a, b and c) and aromatase (d, e and f) mRNA expressions. *Pleurodeles waltl* GMI complexes were dissected from ZZ and ZW larvae at stage 54^{30d}. Digoxigenin labeled aromatase and ER α probes were revealed by alkaline phosphatase labeled anti-DIG antibodies using NBT-BCIP substrate for aromatase samples and BM purple substrate for ER α . G, gonad; MI, mesonephros-interrenal complex; FB, fat body. Bars indicate 1 mm.

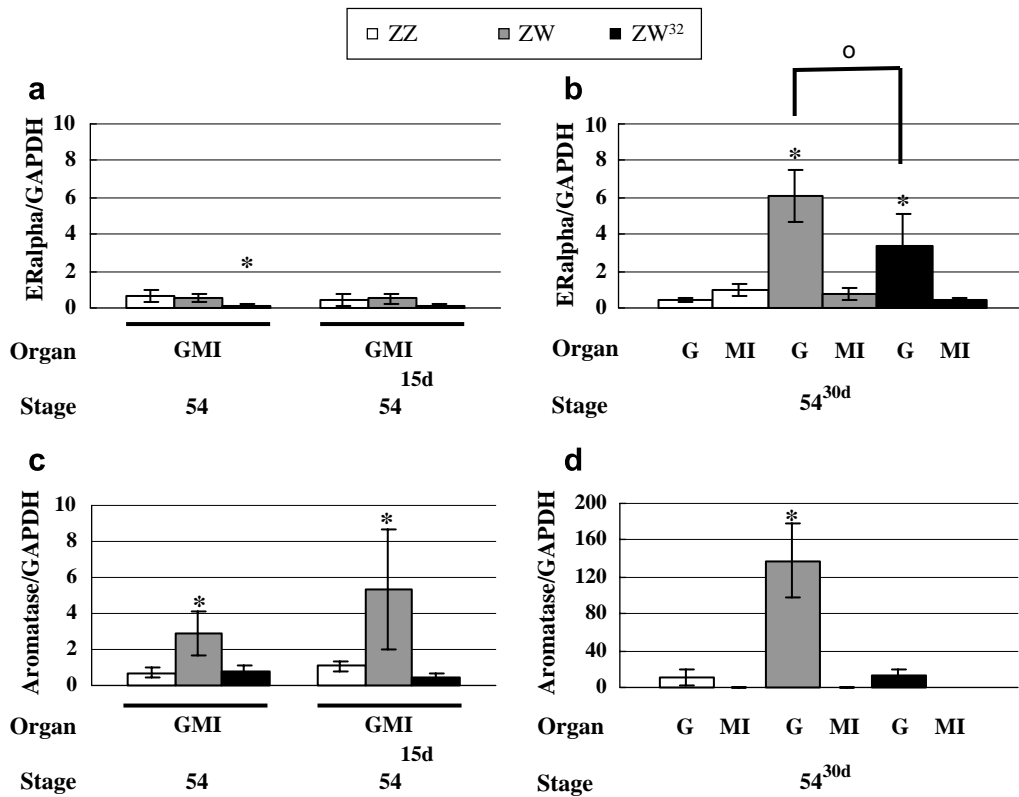


Fig. 7. Analysis of ER α (a and b) and aromatase (c and d) mRNA expressions by real-time PCR. *Pleurodeles waltl* larval development was realized in standard (ZZ, ZW) and sex reversing conditions (ZW³²). At early stages (stages 54 and 54^{15d}) analyses were performed on pools of gonad-mesonephros-interrenal (GMI) complexes; afterwards (stages 54^{30d}) expressions were analyzed in gonad (G) and mesonephros-interrenal complex (MI) separately. Aromatase and ER α mRNA amounts were normalized with GAPDH which represented a homogenous level among the samples. *Significant difference among a group ($P < 0.05$); ° significant difference between ZW and ZW³² ($P < 0.05$).

ER α expression is specific of full ovarian differentiation. In *Trachemys scripta*, a species with temperature dependent sex determination, ER expression begins at an early stage and increases during female differentiation (Bergeron et al., 1998). In chicken females, where only the left gonad differentiates into an ovary, ER is expressed only in the left gonad (Nakabayashi et al., 1998).

Our results are in agreement with the fact that both genetic sexes have the ability to respond to estrogens and to differentiate as females. The raise of ER α expression is delayed compared to that of aromatase expression: it occurs during full ovarian differentiation when estrogen production is already high. This suggests that ER α could regulate its own expression since two half ERE adjacent with an AP1 binding site are identified in the *pW*ER α 1528 bp 5'-flanking region, in the proximal region of the putative TATA box transcription initiation signal. Such a construction is known to be sufficient for estradiol dependent promoter activation (Klein-Hitpass et al., 1988; Corthesy et al., 1989; Ponglikitmongkol et al., 1990). Indeed, in the promoter region of target genes, imperfect ERE sequences are commonly found, which are typically less potent activators of transcription than the consensus one (Klein-Hitpass et al., 1988). In xenopus vitellogenin B1 promoter region, two imperfect ERE close to the TATA box show an additive activation of transcription and a synergistic effect is observed *in vitro* when the construction contains an AP1 binding element (Chang et al., 1992). A similar promoter organization is observed in zebrafish ER α gene wherein ER α is the most potent at inducing the expression of its own gene in the presence of estradiol (Menuet et al., 2004). Thus, in *Pleurodeles waltl*, we may suggest a feedback of estrogens on ER α expression. In contrast, in the anuran amphibian *Xenopus laevis*, no functional ERE was present in the promoter (Lee et al., 1995). Surprisingly, an imperfect ERE was found by these authors in the coding region of *x*/ER α gene. Transient transfection experiments and gel mobility shift assays indicated that this site was a weak, but functional, ERE (Lee et al., 1995). Similarly, putative half ERE are present in *pW*ER α coding region, but their functionality has to be tested. Another interesting finding in *Pleurodeles* ER α promoter is the overlapping Oct1-Forkhead binding site. Indeed, FoxL2, a transcription factor of the Forkhead family, is involved in ovarian differentiation in different vertebrate species (Govoroun et al., 2004; Baron et al., 2004; Ottolenghi et al., 2005; Nakamoto et al., 2006). In tilapia and goat, FoxL2 was found to directly bind to its response element (ACAAATA) in the promoter region of P450 aromatase (Pannetier et al., 2006; Wang et al., 2007). So, FoxL2 could also be involved in *Pleurodeles waltl* female differentiation by regulating ER α expression.

We have performed experiments in the context of temperature induced sex reversal. At stage 54, when there is no difference in ER α expression between ZZ and ZW larvae, in ZW larvae reared at 32 °C ER α expression is at a very low level. Given that analyses were realized on GMI

complexes, inhibition may occur in gonads as well as in mesonephros. At stage 54^{30d}, ER α expression in gonads of ZW larvae reared at 32 °C is intermediate between ZW and ZZ larvae expressions, demonstrating an inhibitory effect of temperature on ER α expression. This result could be related to the presence of numerous HSE clusters in *pW*ER α promoter. In comparison, at all stages (from 54 to 54^{30d}), the expression of aromatase in ZW larvae reared at 32 °C is at the same level than in ZZ larvae (this study; Kuntz et al., 2003b). This demonstrates that temperature acts upstream of steroids in repressing directly or indirectly estrogen synthesis.

To conclude, we have isolated a full-length *pW*ER α cDNA together with a 5'-flanking genomic sequence, which is, to our knowledge the first ER α promoter region described in urodele amphibians. Expression studies during larval development are in agreement with the well known role of estrogen in female differentiation. Studies at the protein level and under steroid treatments are now necessary to complete these observations.

Acknowledgments

We thank Corine Cotinot and Michel Guillomot of “Jouy-en-Josas INRA” center for their advice and help in whole mount *in situ* hybridization. We thank Martine Chillet and Julie Menet for technical assistance and animal rearing. We are also grateful to Dr H. Dumond for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants of the “Université Henri Poincaré (BQR)”, of the “Ligue Contre le Cancer, comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et de la Haute Marne” and of the “Association pour la Recherche sur le Cancer”. Chia-I KO was recipient of grants from the French “Ministère des Affaires Etrangères” and from Luxembourg “Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche” (BFR05/010).

References

- Arenas, M.I., Royuela, M., Lobo, M.V., Alfaro, J.M., Fraile, B., Paniagua, R., 2001. Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and estrogen receptor-beta (ER-beta) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus marmoratus* during the annual cycle. *J. Anat.* 199, 465–472.
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X., Fellous, M., Guiguen, Y., Veitia, R.A., 2004. An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 705–715.
- Bergeron, J.M., Gahr, M., Horan, K., Wibbels, T., Crews, D., 1998. Cloning and *in situ* hybridization analysis of estrogen receptor in the developing gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Dev. Growth Differ.* 40, 243–254.
- Bernard, D.J., Bentley, G.E., Balthazart, J., Turek, F.W., Ball, G.F., 1999. Androgen receptor, estrogen receptor alpha, and estrogen receptor beta show distinct patterns of expression in forebrain song control nuclei of European starlings. *Endocrinology* 140, 4633–4643.
- Brand, H., Kos, M., Denger, S., Flouriot, G., Gromoll, J., Gannon, F., Reid, G., 2002. A novel promoter is involved in the expression of

- estrogen receptor alpha in human testis and epididymis. *Endocrinology* 143, 3397–3404.
- Carreau, S., Bourguiba, S., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., 2002. Testicular aromatase. *J. Soc. Biol.* 196, 241–244.
- Chang, T.C., Nardulli, A.M., Lew, D., Shapiro, D.J., 1992. The role of estrogen response elements in expression of the *Xenopus laevis* vitellogenin B1 gene. *Mol. Endocrinol.* 6, 346–354.
- Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C., Dournon, C., 1995. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 100–107.
- Chardard, D., Dournon, C., 1999. Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool.* 283, 43–50.
- Chardard, D., Kuntz, S., Chesnel, A., Flament, S., 2003. Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool.* 296, 46–55.
- Corthesy, B., Cardinaux, J.R., Claret, F.X., Wahli, W., 1989. A nuclear factor I-like activity and a liver-specific repressor govern estrogen-regulated in vitro transcription from the *Xenopus laevis* vitellogenin B1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5548–5562.
- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138, 4613–4621.
- Dournon, C., Houillon, C., 1985. Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'Amphibien Urodele *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. *Reprod. Nutr. Dev.* 25, 671–688.
- Filby, A.L., Tyler, C.R., 2005. Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Biol. Reprod.* 73, 648–662.
- Foidart, A., Lakaye, B., Grisar, T., Ball, G.F., Balthazart, J., 1999. Estrogen receptor-beta in quail: cloning, tissue expression and neuro-anatomical distribution. *J. Neurobiol.* 40, 327–342.
- Gallien, L., 1951. Unisexual progeny of a female *Pleurodeles waltlii* Michah, subjected, during the larval stage, to the gynogenic effect of estradiol benzoate. *C.R. Acad. Sci.* 233, 828–830.
- Gallien, L., Durocher, M., 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl*. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 91, 97–114.
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C., 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12 (6), 543–548.
- Grandien, K., Backdahl, M., Ljunggren, O., Gustafsson, J.A., Berkenstam, A., 1995. Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology* 136, 2223–2229.
- Govoroun, M.S., Pannetier, M., Pailhoux, E., Cocquet, J., Brillard, J.P., Couty, I., Batellier, F., Cotinot, C., 2004. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev. Dyn.* 231, 859–870.
- Griffin, C., Flouriot, G., Sonntag-Buck, V., Gannon, F., 1999. Two functionally different protein isoforms are produced from the chicken estrogen receptor-alpha gene. *Mol. Endocrinol.* 13, 1571–1587.
- Griffin, C., Flouriot, G., Sonntag-Buck, V., Nestor, P., Gannon, F., 1998. Identification of novel chicken estrogen receptor-alpha messenger ribonucleic acid isoforms generated by alternative splicing and promoter usage. *Endocrinology* 139, 4614–4625.
- Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., Mcmeel, O.M., Martin, S.A., Fostier, A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 54, 154–162.
- Halm, S., Martinez-Rodriguez, G., Rodriguez, L., Prat, F., Mylonas, C.C., Carrillo, M., Zanuy, S., 2004. Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 223, 63–75.
- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A., Thomas, P., 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10751–10756.
- Katsu, Y., Bermudez, D.S., Braun, E.L., Helbing, C., Miyagawa, S., Gunderson, M.P., Kohno, S., Bryan, T.A., Guillette Jr., L.J., Iguchi, T., 2004. Molecular cloning of the estrogen and progesterone receptors of the American alligator. *Gen. Comp. Endocrinol.* 136, 122–133.
- Katsu, Y., Kohno, S., Oka, T., Mitsui, N., Tooi, O., Santo, N., Urushitani, H., Fukumoto, Y., Kuwabara, K., Ashikaga, K., Minami, S., Kato, S., Ohta, Y., Guillette Jr., L.J., Iguchi, T., 2006. Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ERalpha; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 257–258, 84–94.
- Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U., Heitlinger, E., Cato, A.C., 1988. A 13bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res.* 16, 647–663.
- Kos, M., Reid, G., Denger, S., Gannon, F., 2001. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol. Endocrinol.* 15, 2057–2063.
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M., Chambon, P., 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5, 891–897.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870.
- Kuntz, S., Chardard, D., Chesnel, A., Grillier-Vuissoz, I., Flament, S., 2003a. Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenet. Genome Res.* 101, 283–288.
- Kuntz, S., Chesnel, A., Duterque-Coquillaud, M., Grillier-Vuissoz, I., Callier, M., Dournon, C., Flament, S., Chardard, D., 2003b. Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 89–100.
- Kuntz, S., Chardard, D., Chesnel, A., Ducatez, M., Callier, M., Flament, S., 2004a. Expression of aromatase and steroidogenic factor 1 in the lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology* 145, 3111–3114.
- Kuntz, S., Chesnel, A., Flament, S., Chardard, D., 2004b. Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltl*. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 717–727.
- Lambard, S., Carreau, S., 2005. Aromatase and oestrogens in human male germ cells. *Int. J. Androl.* 28, 254–259.
- Lee, J.H., Kim, J., Shapiro, D.J., 1995. Regulation of *Xenopus laevis* estrogen receptor gene expression is mediated by an estrogen response element in the protein coding region. *DNA Cell Biol.* 14, 419–430.
- Lutz, I., Blodt, S., Kloas, W., 2005. Regulation of estrogen receptors in primary cultured hepatocytes of the amphibian *Xenopus laevis* as estrogenic biomarker and its application in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 141, 384–392.
- Menuet, A., Anglade, I., Flouriot, G., Pakdel, F., Kah, O., 2001. Tissue-specific expression of two structurally different estrogen receptor alpha isoforms along the female reproductive axis of an oviparous species, the rainbow trout. *Biol. Reprod.* 65, 1548–1557.
- Menuet, A., Le, P.Y., Torres, O., Kern, L., Kah, O., Pakdel, F., 2004. Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2. *J. Mol. Endocrinol.* 32, 975–986.
- Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T., Mizuno, S., 1998. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J. Mol. Endocrinol.* 20, 193–202.

- Nakamoto, M., Matsuda, M., Wang, D.S., Nagahama, Y., Shibata, N., 2006. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 353–361.
- Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz, J.E., 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.
- Pakdel, F., Metivier, R., Flouriot, G., Valotaire, Y., 2000. Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene. *Endocrinology* 141, 571–580.
- Pannetier, M., Fabre, S., Batista, F., Kocer, A., Renault, L., Jolivet, G., Mandon-Pepin, 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.
- Pieau, C., Dorizzi, M., 2004. Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J. Endocrinol.* 181, 367–377.
- Ponglikitmongkol, M., White, J.H., Chambon, P., 1990. Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J.* 9, 2221–2231.
- Sabo-Attwood, T., Kroll, K.J., Denslow, N.D., 2004. Differential expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isoforms alpha, beta, and gamma by estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 218, 107–118.
- Smith, C.A., Sinclair, A.H., 2004. Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays* 26, 120–132.
- Takase, M., Iguchi, T., 2007. Molecular cloning of two isoforms of *Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis* estrogen receptor mRNA and their expression during development. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 172–181.
- Tiffocche, C., Chesnel, A., Jego, P., Le Pennec, J.P., 1993. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a Pleurodeles lectin. *Eur. J. Biochem.* 213, 901–907.
- Wang, D.S., Kobayashi, T., Zhou, L.Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K., Nagahama, Y., 2007. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 21, 712–725.
- Whitfield, G.K., Jurutka, P.W., Haussler, C.A., Haussler, M.R., 1999. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 110–122.
- Wu, K.H., Tobias, M.L., Thornton, J.W., Kelley, D.B., 2003. Estrogen receptors in *Xenopus*: duplicate genes, splice variants, and tissue-specific expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 38–49.

Les travaux précédents ont fait aussi l'objet d'un article de revue sur la différenciation sexuelle du pleurodèle.

Sexual development of the urodele amphibian Pleurodeles waltl. Dumond Hélène, Kuntz Sandra, Chesnel Amand, Ko Chia-I, Wallacides Angéline, Chardard Dominique, Flament Stéphane. Sex Dev. 2008;2(2):104-14.

Sexual Development of the Urodele Amphibian *Pleurodeles waltl*

H. Dumond S. Kuntz A. Chesnel C.-I. Ko A. Wallacides D. Chardard
S. Flament

EA 3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Nancy-Université,
Nancy, France

Key Words

Amphibian · Germ cells · Parabiosis · Sex differentiation · Steroid hormones · Urodele

Abstract

Pleurodeles waltl is a urodele amphibian that displays a ZZ/ZW genetic mode of sex determination involving a putative W-borne dominant determinant. This determining pathway can be environmentally inhibited since heat treated ZW larvae undergo a functional female to male sex reversal. Moreover, both genetic sexes can be reversed by treatment of larvae with steroid hormones suggesting they are the major players in the differentiation process. Indeed we demonstrated that i) aromatase expression and activity increase just before ovarian differentiation, ii) aromatase inhibitors induce a female to male sex reversal, iii) estrogens induce male to female sex reversal whereas the opposite is obtained with non-aromatizable androgens, iv) steroidogenic factor 1 and estrogen receptor alpha both display a female-enriched expression following the increase in aromatase activity. The role of endogenous hormones was investigated in a parabiosis model. Surprisingly, in ZW/ZZ associations, the ZW gonad could not differentiate suggesting that the ZZ parabiont produces an inhibiting factor, prior to ovarian differentiation. The role of AMH in this process is discussed, keeping in mind that Müllerian ducts are maintained in males. The de-

velopment of antibodies and new molecular tools in the near future should help us to better understand the sexual development of this vertebrate.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Pleurodeles waltl, the Iberian ribbed newt, is a member of the Salamandridae family. This urodele amphibian is found in Portugal, Spain and Northwest Africa. The species was introduced as an experimental model in different European laboratories at the beginning of the 20th century, to study limb regeneration, embryo development and sex differentiation. Embryos develop from eggs laid in water, protected by the vitelline envelope and distinct jelly layers. After hatching, they become larvae that possess gills and live underwater until they metamorphose into air breathing forms possessing lungs (fig. 1). Sexual maturity is reached at 1.5 years. The first studies about sex differentiation were performed by Louis Gallien in Paris in 1950. In the present article, we review the findings about sex determination/differentiation of *Pleurodeles waltl*, most of them obtained in our laboratory in Nancy, France. First we describe sex determination and germ cell specification. Then we focus on the key role of steroids in sex differentiation and discuss the potential involvement of other hormones based on parabiosis experiments.

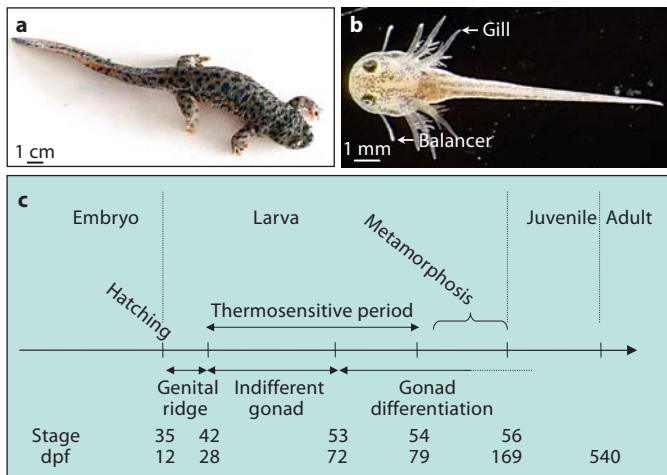


Fig. 1. Development of *Pleurodeles waltl*. **a** A three-year-old adult female. Gills have disappeared and breathing organs consist of lungs. **b** Larva at stage 37. The breathing organs consist of three pairs of external gills. Limb development is not yet completed and the balancer is present. **c** Schematic representation showing the main developmental steps. The relationship between developmental stage and age (number of days post fertilization = dpf) is indicated. Three periods of gonad formation are indicated: genital ridge, indifferent gonad and gonad differentiation. The thermosensitive period is the developmental window during which genetically female larvae (ZW) have to be reared at 32°C to obtain sex reversal.

Sex Determination

Pleurodeles waltl is a gonochoristic species with genetic sex determination: males are determined by the monogametic ZZ genotype while females display a heterogametic ZW genotype. The control of sex determination by a ZZ/ZW system was deduced from estrogen-induced sex reversal experiments [Gallien, 1951, 1954]. Indeed, when standard larvae were treated with estradiol benzoate, they differentiated as females which when mated with standard males, led in 50% of the cases to all-male progenies (fig. 2). The W-borne dominant character of female sex was evidenced by the analysis of the tetraploid progeny obtained from crosses between diploid males and triploid females (obtained by fertilization after a heat shock performed during meiosis 2 inhibiting second polar body extrusion) [Beetschen, 1967]. The lack of males was interpreted by Beetschen as a consequence of the ZWW or ZZW triploid genotype of the oocytes while spermatozoa are always of the Z type. Tetraploid larvae could also be obtained from fertilized diploid eggs after heat-treatment performed during the first-segmentation stage. As ex-

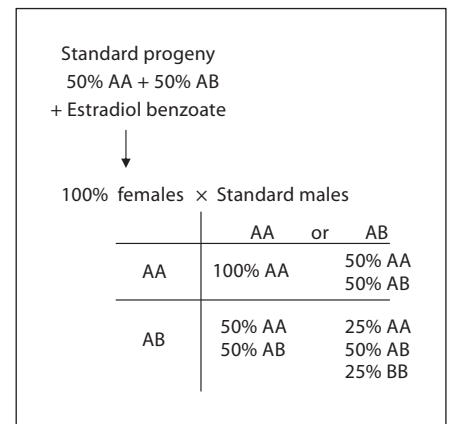


Fig. 2. Demonstration of the homogametic genotype of *Pleurodeles* males. AA homogametic sex, AB heterogametic sex. All-male progenies can be obtained only in case of male homogametic sex.

pected, a 1/1 sex ratio was observed with 50% ZZZZ/50% ZZWW genotype [reviewed by Jaylet, 1972]. Although in *Pleurodeles*, sex chromosomes could not be identified in conventional karyotypes performed on mitotic chromosomes, microscopic observation of lampbrush chromosomes from prophase I-arrested oocytes pointed out a heteromorphism on chromosome 4 (i.e. sex chromosome pair) [Lacroix 1968a, b]. Together, these results demonstrated that (female) sex is determined by a dominant W chromosome in the *Pleurodeles waltl* species.

Further, biochemical investigations [Ferrier et al., 1980] allowed sexing of *Pleurodeles waltl* larvae before gonadal sex determination. Indeed, two electrophoretically separable valyl-leucine specific endopeptidases were found to be encoded by two distinct genes localized on chromosome Z (peptidase-1 A) and chromosome W (peptidase-1 B/β). This feature was of great interest in order to analyse the effect of heat treatment on gonadal sex differentiation and sex reversal [Dournon and Houillon, 1984].

Indeed, genetic sex determination in *Pleurodeles waltl* can be counteracted by temperature [Houillon and Dournon, 1978]. For maximal efficiency, temperature should be maintained at 32°C and heat treatment should be performed from stage 42 to stage 54, a developmental window defined as the thermosensitive period (TSP) (fig. 1) [Dournon and Houillon, 1984]. In this case, standard 50% ZZ/50% ZW progenies develop as 100% phenotypically male larvae [Dournon and Houillon, 1984]. This heat treatment was hypothesized to specifically repress W-dependent determination since only ZW larvae

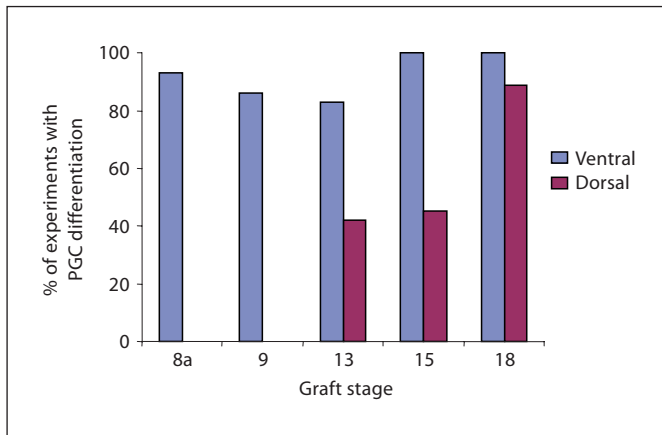


Fig. 3. Inhibition of germ cell specification in graft experiments. Mesodermal explant extirpated at successive stages of development, from young gastrula to mid-neurula (stages 8a, 9, 13, 15 and 18) were grafted in the tail-bud ventral or dorsal region. In the larva, the analysis of the prestations formed by the graft according to its age and its location on the host was made in serial sections. Primordial germ cells differentiated essentially in ventral location. The inhibiting effect of dorsal location concerning germ cell differentiation was maximum at the beginning of gastrulation, then decreased and finally disappeared at the onset of neurulation [modified from Capuron and Maufroid, 1981].

are sex-reversed into phenotypic males [Dorazi et al., 1995]. ZW sex-reversed larvae obtained by heat treatment appeared to differentiate fertile gonads: they could be mated with standard females in order to obtain a particular progeny containing 25% WW females. This feature shows that the sex of the gonadal soma is a major factor involved in the germ cell sexual differentiation that could be considered as non-autonomous. Practically, a WW female is of great interest since, when mated with a standard ZZ male, it allows to obtain a 100% ZW female offspring.

Germ Cell Specification

In *Pleurodeles waltl* as in other urodele amphibians, the segregation of germ cell lineage among somatic cells occurs through cell-cell interactions like in mammals [Maufroid and Capuron, 1985; Hayashi et al., 2007]. In contrast to this epigenetic process, in anuran amphibians such as *Xenopus*, germ cells are specified through preformation. In this case, germ cells can easily be identified very early in embryogenesis, and their specification results from the localization in the egg of maternally inherited determinants [Hayes, 1998].

The segregation of germ cell lineage occurs relatively late in embryonic development of *Pleurodeles waltl* [Capuron and Maufroid, 1981]. The time, the site of origin and the nature of the signals involved have been a controversial issue for several decades. In the seventies, Maufroid and Capuron [1973] cultured the ventral or ventro-lateral parts of the marginal zone from a blastula into the blastocoele of a young gastrula and demonstrated that primordial germ cell (PGC) precursors are located in the presumptive mesoderm. Since the mesodermal origin of PGC precursors has also been described in two *Triturus* species [Nieuwkoop, 1947] and in *Ambystoma* [Smith, 1964], it seems to be a common feature of urodele amphibians.

When the ectoderm and the endoderm of young gastrulae were associated and cultured in vitro, dorsal endoderm mainly induces notochord, somites and pronephric tubules while ventral endoderm promotes pronephric tubules, mesenchyme and PGC differentiation [Maufroid and Capuron 1977a, b]. Therefore, PGCs arise from totipotent ectodermal cells induced by an unknown signal from ventral endoderm. The results also suggested an inhibitory role of the chordomesoderm on PGC specification [Capuron and Maufroid, 1981]. In mammals, PGCs arise from the proximal epiblast through Bone Morphogenetic Protein (BMP) inductive signals from the extra-embryonic ectoderm and visceral endoderm [Matsui and Okamura, 2005]. Since we now know that differentiating notochord secretes several BMP antagonists (chordin, noggin, follistatin), one can hypothesize that BMP-dependent PGC specification could be conserved between urodeles and mammals.

In order to determine the stage of germline segregation, ventral endoderm from different stages was associated with ectoderm [Maufroid and Capuron, 1977b]. The inductive capability on PGC formation was maximal at the beginning of gastrulation (stage 8a, 95%), then decreased progressively (stage 9, 44%; stage 10, 9.33%) and finally stopped at neurulation (stage 13). Moreover, grafts of mesodermal explants extirpated from young gastrula to mid neurula (stages 8a, 9, 13, 15 and 18) on dorsal or ventral region from tailbud embryos (stage 22) showed that inhibition of PGC formation by dorsal structures of host embryos disappears from stage 13 [Capuron and Maufroid, 1981] (fig. 3).

This suggests that PGCs arise from a pool of somatic cells from stage 8a (probably through BMP signaling) but also indicates that germline fate is definitely specified at stage 13.

Recently, isolation of the germline specific molecular marker VASA in *Ambystoma mexicanum* [Bachvarova et al., 2004] did not allow the identification of PGC precursors at the time of their specification since maternal VASA transcript accumulates in the oocyte and persists until hatching. Similar results were obtained in *Pleurodeles waltl*, in which zygotic expression of VASA ortholog was detected from stage 33 (our unpublished results). Therefore, the expression of other molecular markers, namely those of pluripotency, remains to be analyzed in the course of *P. waltl* development to specify the stage and the location of germ cell specification.

Sex Differentiation

The gonads originate from an out-pocket of cells localized on the ventral area of the anterior moiety of the mesonephros. As described above, PGCs originate from an extragonadal region, migrate to colonize the somatopleure and constitute a genital ridge. At stage 35, they are located in the posterior region of the larvae near the Wolffian ducts and close to the future cloaca [Dournon et al., 1989]. The migration takes place between stage 35 and 41 and the undifferentiated gonad is observed from stage 42 to stage 53. At this stage, gonads hang down into the coelomic cavity together with some somatic cells from the genital ridge. At stage 45, more somatic cells constitute a pedicle from which gonads are suspended. At stage 50, the gonadal anlage separates into two parts: the fat body devoid of gonads and the gonad itself. At the periphery of the undifferentiated gonad, the cortex is derived from the coelomic epithelium and contains gonads while in the central part, the medulla is derived from the mesonephros blastema and does not contain gonads.

Just before stage 53, the early histological differentiation of the gonadal sex occurs. In ZW larvae, oogonia stay in the cortex where they proliferate. At stage 54, these cells associate to somatic cells and constitute follicles. Most of the oogonia enter meiosis and this process is arrested at prophase I. The ovary differentiates as an ovisac since medulla regression leaves a cavity (fig. 4a). In ZZ larvae, at stage 53, germ cells migrate from the cortex towards the medulla where they mix with differentiating Sertoli cells in units named cysts that are themselves included in lobules (fig. 4b). The cortex devoid of germ cells becomes albuginea, the testis envelope. So, in *Pleurodeles*, stage 53 is the first stage at which the sex of the gonad may be ascertained by histological examination.

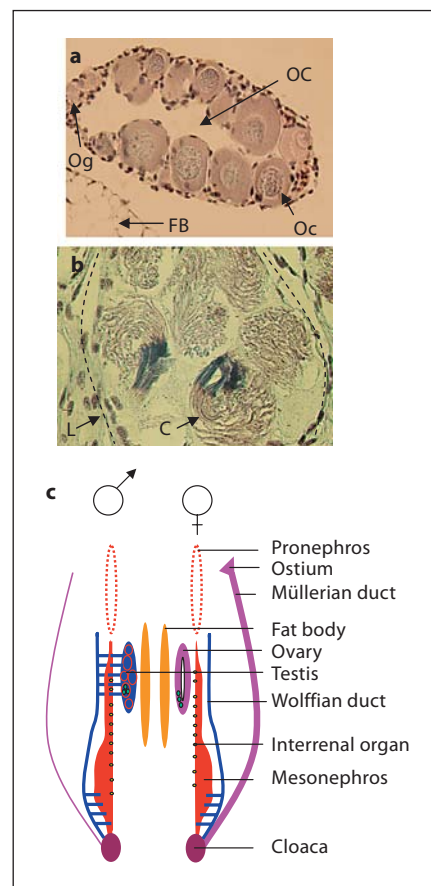


Fig. 4. The genital apparatus of *Pleurodeles waltl*. **a** Histological section of an ovary after metamorphosis. Young vitellogenic oocytes (Oc) arrested in the prophase of the first division of meiosis are located in the cortex and surrounded by follicle cells and theca but oogonia (Og) that have not entered meiosis are still present. In the centre of the ovary, the ovarian cavity (OC) developed after medulla regression is easily observed. A small part of the fat body (FB) is also present. **b** Histological section of the testis of a 1.5-year-old male: spermatogenesis occurs synchronously for all the germ cells in a cyst (C). The section indicates six cysts included in a lobule (L; dotted line). **c** Schematic representation of gonads and tractus organization in both male and female at adulthood. The medulla of the testis contains lobules (red circles) including cysts (green circle) with germ cells. The ovary is an ovisac that contains follicles (green circles) located in the cortex.

The proliferation of germ cells has been studied in larvae [Dournon et al., 1989, 1990]. By mitotic index determination and germ cell counts, three periods have been distinguished: P0 during which there is no proliferation, P1 characterized by a moderate proliferation and P2 with a higher proliferation rate. In ZZ larvae, P0 ends after stage 41 whereas in ZW larvae, this period extends up to stage 45. Then P1 starts and in both ZZ and ZW larvae,

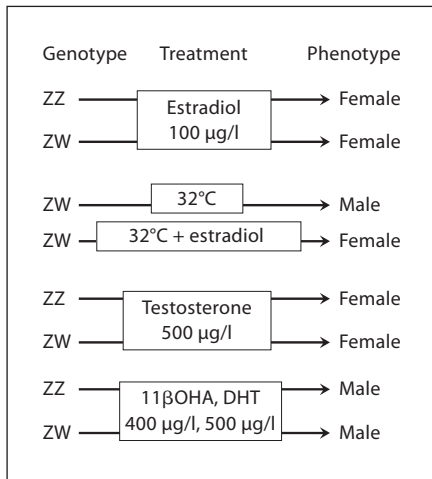


Fig. 5. Summary of the effects of treatments of *Pleurodeles waltl* larvae with steroids. The genotype was determined by peptidase 1 analysis. The phenotype was determined after metamorphosis by morphological examination and histology.

it is observed until stage 49–50. Since the P0 period is longer in ZW larvae, this leads to a lower number of germ cells at the end of the P1 period when compared to ZZ ones. After stage 50, the proliferation rate increases more quickly in ZW larvae than in ZZ. ZW larvae possess a higher number of germ cells than ZZ larvae up to stage 54 + 60 days at which meiosis entry occurs in ZW larvae [Dumond et al., 2008]. The effect of temperature on germ cell proliferation was also studied [Dournon et al., 1990]. There was no difference in the number of germ cells observed at stage 53 between ZZ larvae and heat-treated ZW larvae but the latter possessed a lower number of germ cells than control ZW individuals.

When compared to other vertebrates, differentiation is a slow process in this species: it occurs during larval life around metamorphosis [Kuntz et al., 2003a]. Some events also occur after metamorphosis especially in males: meiosis entry occurs in juvenile animals while old adults display multiple testes. This means that in each male gonad, several lobes develop successively during adult life. The formation of these lobes has been studied in detail in other amphibians like *Salamandra salamandra* [Joly, 1971] but not yet in *Pleurodeles waltl*.

Once differentiated, gonads will produce hormones that will influence tractus differentiation. In ZW larvae, Wolffian ducts will be maintained since they will be required for urine elimination (there is no metanephros and hence no secondary ureter) and Müllerian ducts will differentiate into oviducts (fig. 4c). In ZZ larvae, Wolff-

ian ducts will differentiate as a uro-spermiduct whereas Müllerian ducts will be maintained without differentiation (fig. 4c). The persistence of Müllerian ducts in males can be demonstrated easily by estradiol treatment: it triggers oviduct differentiation, even when performed at adulthood [Tiffoche et al., 1993].

Estrogens

Steroids were the first identified molecular players in gonad differentiation in amphibians. A gynogenic effect of estradiol has been described in several species including *Pleurodeles waltl*: 100% of the larvae from standard offspring differentiated as females when reared in water supplemented with estradiol benzoate at a concentration of 600 µg/l [Gallien, 1950]. Nevertheless, these animals were sterile due to an inhibitory effect of high estrogen dosage on Müllerian duct development. Treatments with a lower dose (100 µg/l) produced fertile animals (fig. 5) and, as mentioned above, analysis of the offspring of these sex reversed individuals revealed that in *Pleurodeles waltl*, males were homogametic [Gallien, 1951]. Although a hormone-sensitive period has been defined from stage 51 to 56, we could obtain a complete sex reversal of ZZ larvae when estradiol treatment was performed between stages 42 and 54 (thermosensitive period) [Chardard et al., 2003]. This points the stages 52 to 54 as the critical developmental window of estradiol sensitivity. However, it is very conceivable that gonads retain potential to respond to estrogens after this stage (as described in other species). Besides, the masculinizing effect of temperature was inhibited when estradiol was added to the rearing water [Zaborski, 1986] (fig. 5). This suggests that estradiol synthesis is impaired in case of heat treatment.

Aromatase

In *Pleurodeles waltl*, as in other vertebrate models, gonads of young larvae are not big enough to allow steroid dosages but aromatase activity measurements are particularly suited. A low aromatase activity was detected in gonad-mesonephros-interrenal organ (GMI) complexes from stage 47. The activity started to increase in females from stage 52 and reached 500-fold the activity observed in males at metamorphosis [Chardard et al., 1995]. mRNA analyses were performed to determine if the changes in enzyme activity could be due to modifications of expression level. In situ hybridization (ISH) studies showed that

aromatase mRNAs were not present in the mesonephros [Kuntz et al., 2003b]. In the gonads at stage 54, ISH indicated a female-enriched expression that was not observed in heat-treated ZW larvae [Kuntz et al., 2003b]. Recently, a whole-mount ISH study performed at this stage confirmed the high difference between male and female aromatase expression [Ko et al., 2008]. In the same study, real-time PCR analyses showed a 4-fold difference in mRNA level at stage 54 and 50-fold at stage 54 + 30 days [Ko et al., 2008].

During female to male sex reversal upon heat treatment, aromatase activity and expression in ZW larvae are at levels similar to that observed in ZZ larvae [Chardard et al., 1995; Kuntz et al., 2003b]. In the same way, during male to female sex reversal upon estrogenic treatment, a raise of gonadal aromatase activity is observed, although delayed when compared to standard females [Kuntz et al., 2003a].

Some studies have focused on the potential role of the brain in initiating gonadal development in reptile embryos or environment-induced sex reversal in hermaphrodite fishes [For instance see Jeyasuria and Place, 1998; Piferrer and Blazquez, 2005]. In *Pleurodeles waltl*, cerebral aromatase expression or activity is neither sex specific nor temperature sensitive suggesting that estrogen production in the brain does not interfere with gonadal differentiation [Kuntz et al., 2004a].

The most important evidence of the involvement of estrogens in ovarian development was obtained by treatments with aromatase inhibitors. Indeed, ZW larvae treated with fadrozole differentiated into males at metamorphosis [Chardard and Dournon, 1999]. Aromatase activity dosage and histological analysis performed during the period of treatment showed that sex reversal was correlated with aromatase activity: some individuals escaped fadrozole effect showing an increase in aromatase activity and differentiated in females [Chardard and Dournon, 1999].

We can conclude that a high level of aromatase expression and activity is always correlated with ovarian differentiation so that analysis of aromatase regulation is essential in order to understand *Pleurodeles waltl* sex differentiation.

Steroidogenic Factor 1

The nuclear orphan receptor SF-1 is expressed in several tissues involved in reproduction and/or steroidogenesis, mainly in brain, testis, ovary and adrenal (interrenal

organ in amphibians). Besides, as observed in several species, an SF-1 consensus binding site is conserved in the 5'-flanking region (GenBank accession number EU492904) of *Pleurodeles* aromatase encoding gene (unpublished). Hence we hypothesize that SF-1 could be involved in the transcriptional regulation of aromatase in *Pleurodeles waltl*.

A *Pleurodeles* SF-1 cDNA was cloned from adult testis [Kuntz et al., 2006]. The analysis of the deduced protein sequence suggested that SF-1 biological function could be conserved in this species. *Pleurodeles* SF-1 transcripts were detected in all adult steroidogenic tissues [Kuntz et al., 2006] as well as in spleen, as observed in *Rana rugosa* [Kawano et al., 1998], and in lung where aromatase activity is also present [Kuntz et al., 2004b].

In GMI, SF-1 mRNAs were detected as soon as stage 42 in ZZ and ZW larvae, as well as in ZW larvae reared at 32°C. This early presence of SF-1 mRNA in GMI could be correlated to its role in the first differentiation steps of the two primary steroidogenic organs: the gonads and interrenal organ as demonstrated in other species [Luo et al., 1994]. SF-1 expression was observed at all stages of TSP (stages 42–54) and appeared sex- and temperature-independent during this period. However, during TSP, whether SF-1 is expressed in gonads or mesonephros-interrenal organ or both in *P. waltl* is not known at that time. Besides, further investigations are required to determine if aromatase producing cells also express SF-1.

Surprisingly, after the beginning of ovary differentiation, semi-quantitative RT-PCR analyses showed a transient increase of the SF-1 transcript level in female GMI. The analyses performed between stages 54 and 56 revealed the expression of SF-1 in both gonads and MI compartments. Besides, in MI alone, a similar transient increase in SF-1 expression in ZW larvae was observed later than in the gonads.

From these observations, it was hypothesized that SF-1 gene transcription could be positively regulated by estrogens in *Pleurodeles waltl*. This hypothesis was supported by the fact that an up-regulation of SF-1 mRNA expression could be triggered by using an exogenous stimulation with estradiol benzoate [Kuntz et al., 2006]. However, whether estrogens had a direct or indirect effect on SF-1 expression is not known.

Whether SF-1 gene could be a target of temperature in *Pleurodeles waltl* in case of sex-reversal is another question we addressed. In gonads of ZW larvae reared at 32°C during TSP, SF-1 expression was lower than in control ZW larvae. According to the results of estrogen treatments, this could be due to the inhibition of both aroma-

tase expression and activity usually observed in case of long term heat treatment leading to sex-reversal [Chardard et al., 1995; Kuntz et al., 2003b; Ko et al., 2008]. However, when larvae are submitted to a 48-hour heat shock, the SF-1 mRNA level in gonads does not decrease. These results support the hypothesis of a regulation of SF-1 gene expression by the estrogen level rather than by a more direct effect of temperature.

ER α

Recently, we have isolated a full-length Estrogen Receptor (ER) cDNA wherein a deduced ORF encodes a 582 amino acid polypeptide [Ko et al., 2008]. Multiple alignments of protein sequences strongly suggest that we have cloned an ER α ortholog since we can observe a high degree of homology with ER α from other vertebrates (for instance 90.2% identity to Japanese giant salamander (urodele), 81.3% to *Xenopus laevis* (anuran), and 67% to mouse or human) [Ko et al., 2008 and references therein]. The highest percentage of identity is observed for the 'DNA binding domain' and the 'ligand binding domain'. A phylogeny study confirmed the similarity with the Japanese giant salamander ER α , and demonstrated that *pW*ER α was very different from ER β of other vertebrates.

RT-PCR analyses revealed that ER α mRNAs were present in adult ovary and testis, fat body associated to gonads, liver, oviduct and to a lesser extent in spermiduct and intestine. These results are in agreement with i) the action of estrogens in female differentiation [Tiffoche et al., 1993; Kuntz et al., 2003b], ii) the estrogenic control of vitellogenesis [Wu et al., 2003; Lutz et al., 2005] and iii) the potential role of estrogens in spermatogenesis as demonstrated in the newt *Triturus marmoratus* [Arenas et al., 2001] and in mammals [Lambard and Carreau, 2005]. ER α transcripts were not detected in forebrain and lung [Kuntz et al., 2004a, b]. This could suggest the existence of an unknown ER isoform in *Pleurodeles waltl*.

ER α was also studied in the developing larvae. RT-PCR results indicate that ER α mRNA is present in both sexes early before gonad differentiation, from at least stage 48. At stage 54 + 30 days, whole mount ISH reveals a high level of ER α in gonad and fat body, and a lower level in MI while ER α mRNAs are not found in adult kidney. In contrast to this pattern, aromatase expression is strictly restricted to gonads [Kuntz et al., 2003b].

In gonads, at stages 54 and 54 + 15 days, there was no difference in ER α mRNA level between male and female larvae whereas differences in both aromatase expression

and activity were already present [Kuntz et al., 2003b; Ko et al., 2008]. At stage 54 + 30 days, a sharp increase in ER α mRNAs was observed in female larvae (14.5-fold difference between males and females). Although ER α expression in mesonephros could mask subtle differences in gonads before stage 54 + 30 days, we assume that a high ER α expression is rather specific of a complete ovarian differentiation.

These results are in agreement with the fact that both genetic sexes can respond to estrogens and differentiate as females. They suggest that estrogens can regulate ER α expression. This hypothesis was supported by the finding of two consensus half-ERE adjacent with an AP1 putative binding site onto the 1449 bp 5' flanking region of *P. waltl* ER α gene [Ko et al., 2008]. Such a situation is sufficient for estradiol-dependent promoter regulation [Klein-Hitpass et al., 1988; Corthesy et al., 1989; Ponglikitmongkol et al., 1990].

Finally, in the context of temperature induced sex reversal, real-time PCR analyses revealed that ER α expression in gonads of ZW larvae raised at 32°C was lower than in control ZW larvae, demonstrating an inhibitory effect of temperature on ER α expression. Although the female-enriched expression of gonadal ER α occurs after the onset of ovary differentiation, the temperature-sensitive feature of ER α expression could be important to obtain a complete sex reversal. Studies under steroid treatments together with analyses at the cellular and protein levels are now necessary to complete these results.

Androgens

Treatments of amphibians (or other species) with androgens have produced a great variety of results [reviewed by Hayes, 1998]. In amphibians, the effects of androgen treatments depend not only on the chemical structure of the androgen, but also on the dosage of the treatment. In *Pleurodeles waltl*, testosterone has an inhibitory effect on gonad development in male and female larvae: when treated by testosterone ZZ larvae show an inhibition of gonad development and then (sometimes much later) a female differentiation (fig. 5). This paradoxical effect was interpreted as a result of the aromatization of exogenous testosterone to estradiol. While treatments with non-aromatizable androgens tend to prove this, the kinetics of both sex reversal are very different. DHT and its derivatives have no effect on ZZ larvae differentiation but they exert a masculinizing effect on female larvae: after the treatment, at metamorphosis, gonads are disorganized

Table 1. Changes in germ cell number, aromatase activity and DMC1 expression in the gonads of different parabiont pairs during larval life [from Dumond et al., 2008]

Stage	GC number ^a			Aromatase activity ^b			DMC1		
	ZW/ZW	ZW/ZZ ^c	ZZ/ZZ	ZW/ZW	ZW/ZZ ^c	ZZ/ZZ	ZW/ZW	ZW/ZZ ^c	ZZ/ZZ
53	162 ± 25 (n = 4)	107 ± 16 (n = 3)	129 ± 13 (n = 4)	ND	ND	ND	-	-	-
54	379 ± 54 (n = 4)	238 ± 24 (n = 4)	118 ± 17 (n = 4)	18.4 ± 2.9 (n = 6)	12.8 ± 2.7 (n = 6)	3.6 ± 1.2 (n = 6)	-	-	-
54 + 60d	547 ± 109 (n = 4)	231 ± 41 (n = 3)	205 ± 48 (n = 4)	ND	ND	ND	+	-	-
54 + 90d	ND	ND	ND	831 ± 176 (n = 3)	9.2 ± 6 (n = 5)	8.5 ± 2.5 (n = 4)	+	-	-

^a Number of germ cells per gonad, expressed as mean ± s.e.m. of several counts.

^b Data indicate 10⁻¹⁵ mol/GMI complex/h as mean ± s.e.m. of several measurements.

^c Among the ZW/ZZ pairs, only the data of the ZW gonad are shown.

and contain few germ cells but they are identified as testes [Chardard et al., 2003]. Another non-aromatizable androgen, 11βOHA proved to have a very efficient masculinizing effect (more than DHT), inducing sex reversal in 100% of ZW larvae. At metamorphosis, testes were smaller but undistinguishable from those of standard males [Chardard et al., 2003]. In both treatments with 5-reduced or 11-oxygenated androgens, sex reversed ZW larvae developed in adult fertile neomales (fig. 5). However, in amphibians, we have a poor knowledge of i) the types of androgen that are produced by the differentiating gonad and ii) the metabolic pathways. We have now to determine if androgen-induced sex reversal is obtained via binding to androgen receptor or via interfering with estrogenic pathway (leading to the inhibition of ovarian differentiation). Until now, no study has been published about androgen receptors in *Pleurodeles waltl*.

Endogenous Hormones

Although many experimental data clearly demonstrate the effect of exogenous steroids on gonad differentiation, we have a poor knowledge of the natural steroids produced by *Pleurodeles* larvae during sex differentiation, of their concentrations as well as of the kinetics of their synthesis. In order to experimentally study the effects that hormones from one sex can exert on the other one, male/female combinations can be performed.

Recently, we have studied parabioses, a model in which two embryos are surgically associated and then develop together with a connection between their circulating system [Dumond et al., 2008]. This association is performed at the tailbud stage (stage 22), from embryos that are manually dejellied and whose vitelline membrane is removed. In an operating dish filled up with Holtfreter's medium, an area of ectoderm and subjacent mesoderm just posterior to the gill bulge is removed from two embryos. These embryos are gently pressed together with modeling clay during several hours to allow the healing of tissues. Animals are then reared at ambient temperature (20 ± 2°C). The genotypic sex of each parabiont (ZZ male or ZW female) is determined before gonad differentiation (stage 50) from the analysis of the sex chromosome borne marker peptidase-1 [Ferrier et al., 1980]. Then studies are performed at different stages of gonad differentiation.

Our study confirmed the inhibition of the ZW gonad development previously reported in other cases of ZZ/ZW associations: graft of the abdominal half of a donor embryo onto the flank of a receptor embryo of the other sex as well as in chimera with abdomen in duplicate [Colletot et al., 1987]. In parabioses, the inhibition of ZW gonad development in ZZ/ZW associations is neither the result of a defect in germ cell migration towards the genital ridge nor of an abnormal proliferation of germ cells in the early gonad since at stage 53, counting of germ cells as well as the expression profile of VASA mRNA showed

the presence of similar numbers of germ cells at this stage in the ZZ and ZW gonads of either homosex or ZZ/ZW associations (table 1) [Dumond et al., 2008].

Germ cell alterations occur later. From stage 54 to stage 54 + 60 days, ZW gonads from heterosex associations do not show germ cell proliferation in contrast to those from ZW/ZW associations (table 1). Besides, these cells do not enter meiosis as demonstrated by the absence of DMC1 expression and the histological data (absence of chromatin condensation and low circularity index) (table 1). At adulthood, germ cells seem to have disappeared in the inhibited ZW gonad of ZZ/ZW associations as demonstrated by the absence of VASA transcript and the histological examination. So, germ cells seem to be lost mainly during the period of metamorphosis. Whether a failure in meiosis entry causes germ cells to die or to de-differentiate during metamorphosis remains to be determined.

We also observed somatic cell alterations. In ZZ/ZW parabioses, the somatic compartment of the ZW gonad clearly remains undifferentiated. Indeed, during metamorphosis, the level of gonadal aromatase activity was very low (table 1). Moreover, in the inhibited ZW gonad in adult ZZ/ZW parabionts, DMRT1 mRNA expression was not detected whereas it was expressed in ZZ gonads. DMRT1 can be expressed in both germ cells and somatic cells, as described in mammals for instance [Pask et al., 2003]. So, it might be interesting to determine in our model if the lack of DMRT1 expression in the inhibited ZW gonads really reflects a lack of masculinization or if it is due to the loss of germ cells which could be required for DMRT1 expression in the somatic compartment.

Conclusion

At the moment, steroids remain the major players of the pattern leading to sex differentiation. However, we have to increase our knowledge about endogenous hormones. This is clearly illustrated from our experiments using parabiosis: the reason for the inhibition of gonad development in ZW parabionts associated to ZZ partners is unknown. A substance produced by the ZZ individual probably acts on the ZW parabiont via the interconnected circulatory systems. The ZZ gonad is very likely the source for this compound since orthotopic grafts of embryonic ZZ gonads into the abdominal cavity of ZW embryos gave similar results [Gallien, 1973]. Androgens cannot explain by themselves this result since treatments of ZW *Pleurodeles* larvae with non-aromatizable andro-

gens lead sometimes to the inhibition of ZW gonad development associated to a reduction in the number of germ cells but most often, these treatments lead to functional sex reversal [Chardard et al., 2003].

Is there anti-Müllerian hormone (AMH) synthesis in the testis of the ZZ partner? AMH is involved in the Freemartin effect in mammals [Capel and Coveney, 2004]. Indeed, AMH not only triggers Müllerian ducts regression but also plays a part in gonad differentiation [Ross et al., 2003]. In rodents, AMH blocks meiosis in fetal ovaries, leading to loss of germ cells and fibrous degeneration, and inhibits the transcription of aromatase, as observed for the ZW parabionts from ZZ/ZW associations [Vigier et al., 1989; Josso et al., 1998; Dumond et al., 2008]. Besides, Müllerian ducts do not disappear during sex differentiation in ZZ individuals, and the role of AMH in *Pleurodeles waltl* has still to be determined.

Retinoic acid (RA) metabolism could also be involved in the inhibition of ZW gonad development in our parabiosis model. Indeed, RA has recently been shown to be involved in meiosis entry control in mammals [Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006]. When applied before gonadal differentiation, RA can induce meiosis entry in organotypic cultures of *P. waltl* GMI complexes (our unpublished results). One might suggest that an early synthesis of the RA-degrading enzyme Cyp26b1 in the ZW parabiont from heterosex associations, as a result of the action of a male circulating product, could delay ZW germ cell differentiation, leading to an abnormal crosstalk between germline and the somatic compartment and inducing gonad alterations.

To conclude, advances have been performed recently in regard to molecular markers of *Pleurodeles waltl* sex differentiation that allowed us to better characterize gonad differentiation. The use of antibodies against several of these markers should lead to an increase of our understanding of the differentiation process.

Acknowledgement

Most of the results reported in this article were supported by grants of the Ligue Contre le Cancer (Comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et de la Haute Marne), of the Association pour la Recherche sur le Cancer, of the Conseil Régional de Lorraine and of the Université Henri Poincaré. Chia-I Ko was recipient of grants from the French 'Ministère des Affaires Etrangères' and from Luxembourg 'Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' (BFR05/010). A. Wallacides was recipient of a grant from the Syrian government (decision 381).

References

- Arenas MI, Royuela M, Lobo MV, Alfaro JM, Fraile B, Paniagua R: Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and estrogen receptor-beta (ER-beta) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus marmoratus* during the annual cycle. *J Anat* 199:465–472 (2001).
- Bachvarova RF, Masi T, Drum M, Parker N, Mason K, Patient R, Johnson AD: Gene expression in the axolotl germ line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axoct-4*, and *Axkit*. *Dev Dyn* 231:871–880 (2004).
- Beetschen JC: Cinq générations d'individus polyploïdes chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *C R Soc Biol* 161:930–936 (1967).
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, et al: Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312:596–600 (2006).
- Capel B, Coveney D: Frank Lillie's freemartin: illuminating the pathway to 21st century reproductive endocrinology. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301:853–856 (2004).
- Capuron A, Mauroid JP: Role of the endoderm in the ventro-lateral mesoderm and primordial germ cells determination in *Pleurodeles waltlii*. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 70:219–226 (1981).
- Chardard D, Dournon C: Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltlii*. *J Exp Zool* 283:43–50 (1999).
- Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dournon C: Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltlii* (urodele amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen Comp Endocrinol* 99:100–107 (1995).
- Chardard D, Kuntz S, Chesnel A, Flament S: Effects of androgen on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltlii*. *J Exp Zool* 296:46–55 (2003).
- Collenot A, Gounon P, Collenot G: Aspects récents de l'étude de la différenciation sexuelle des amphibiens: étude de l'effet free-martin chez le triton Pleurodèle. *Mém Soc Zool France Symp L Gallien* 31–42 (1987).
- Corthesy B, Cardinaux JR, Claret FX, Wahli W: A nuclear factor I-like activity and a liver-specific repressor govern estrogen-regulated in vitro transcription from the *Xenopus laevis* vitellogenin B1 promoter. *Mol Cell Biol* 9:5548–5562 (1989).
- Dorazi R, Chesnel A, Dournon C: Opposite sex determination of gonads in two pleurodeles species may be due to a temperature-dependent inactivation of sex chromosomes. *J Hered* 86:23–31 (1995).
- Dournon C, Houillon C: Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. *Reprod Nutr Dev* 24:361–378 (1984).
- Dournon C, Demassieux C, Durand D, Lesimple M: Primordial germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltlii*: genetic control before gonadal differentiation. *Int J Dev Biol* 33:477–485 (1989).
- Dournon C, Houillon C, Pieau C: Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int J Dev Biol* 34:81–92 (1990).
- Dumond H, Mauroid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A, Flament S: Freemartin in the amphibian *Pleurodeles waltlii*: Parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. *Mol Reprod Dev* 75:439–449 (2008).
- Ferrier V, Jaylet A, Cayrol C, Gasser F, Buisan JJ: Etude électrophorétique des peptidases érythrocytaires chez *Pleurodeles waltlii* (Amphibien, Urodèle): mise en évidence d'une liaison avec le sexe. *C R Acad Sci Série D* 290:571–574 (1980).
- Gallien L: Inversion du sexe (féminisation) chez l'urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah traité par le benzoate d'oestradiol. *C R Acad Sci* 231:919–920 (1950).
- Gallien L: Sur la descendance unisexuée d'une femelle de *Pleurodeles waltlii* Michah ayant subi pendant sa phase larvaire l'action gynogène du benzoate d'oestradiol. *C R Acad Sci* 233:828–830 (1951).
- Gallien L: Inversion expérimentale du sexe sous l'action des hormones sexuelles chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Analyse des conséquences génétiques*. *Bull Biol France Belg* 1:1–51 (1954).
- Gallien L: Différenciation et organogenèse sexuelle des métazoaires (Masson and Co., Paris 1973).
- Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Surani MA: Germ cell specification in mice. *Science* 316:394–396 (2007).
- Hayes TB: Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool* 281:373–399 (1998).
- Houillon C, Dournon C: Inversion of the female sexual phenotype at high temperature in the urodelian amphibian, *Pleurodeles waltlii* Michah. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 286:1475–1478 (1978).
- Jaylet A: Tétraploïdie expérimentale chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Chromosoma* 38:173–184 (1972).
- Jeyasuria P, Place A: Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). *J Exp Zool* 281:428–449 (1998).
- Joly J: Les cycles sexuels de Salamandra (L.). I – Cycle sexuel des males. *Ann Sci Nat* 13:451–504 (1971).
- Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F: The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 145:3–7 (1998).
- Kawano K, Miura I, Morohashi K, Takase M, Nakamura M: Molecular cloning and expression of the SF-1/Ad4BP gene in the frog, *Rana rugosa*. *Gene* 222:169–176 (1998).
- Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC: A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res* 16:647–663 (1988).
- Ko C-I, Chesnel A, Mazerbourg S, Kuntz S, Flament S, Chardard D: Female-enriched expression of ER α during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltlii*. *Gen Comp Endocrinol* 156:234–245 (2008).
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC: Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2474–2479 (2006).
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Flament S: Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltlii*. *Cytogenet Genome Res* 101:283–288 (2003a).
- Kuntz S, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Duterque-Coquillaud M, Flament S, Chardard D: Expression of P450 aromatase during sex differentiation and sex reversal in the amphibian *Pleurodeles waltlii*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:89–100 (2003b).
- Kuntz S, Chesnel A, Flament S, Chardard D: Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltlii*. *J Mol Endocrinol* 33:717–727 (2004a).
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Ducatez M, Callier M, Flament S: Expression of aromatase and steroidogenic factor 1 in the lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltlii*. *Endocrinology* 145:3111–3114 (2004b).
- Kuntz S, Chardard D, Ko C-I, Dumond H, Ducatez M, et al: Female-enriched and thermosensitive expression of steroidogenic factor-1 during gonadal differentiation in *Pleurodeles waltlii*. *J Mol Endocrinol* 36:175–186 (2006).
- Lacroix JC: Etude descriptive des chromosomes en écouvillon dans le genre *Pleurodeles* (Amphibien, Urodèle). *Ann Embryol Morph* 1:179–202 (1968a).
- Lacroix JC: Variations expérimentales ou spontanées de la morphologie et de l'organisation des chromosomes en écouvillon dans le genre *Pleurodeles* (Amphibien, Urodèle). *Ann Embryol Morph* 1:205–248 (1968b).
- Lambard S, Carreau S: Aromatase and oestrogens in human male germ cells. *Int J Androl* 28:254–259 (2005).
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL: A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481–490 (1994).

- Lutz I, Blodt S, Kloas W: Regulation of estrogen receptors in primary cultured hepatocytes of the amphibian *Xenopus laevis* as estrogenic biomarker and its application in environmental monitoring. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141:384–392 (2005).
- Matsui Y, Okamura D: Mechanisms of germ-cell specification in mouse embryos. *Bioessays* 27:136–143 (2005).
- Maufroid JP, Capuron A: Experimental demonstration of germinal cells in the presumptive lateral mesoderm of the young gastrula of *Pleurodeles waltii* (urodele amphibian). *C R Acad Sci D* 676:821–824 (1973).
- Maufroid JP, Capuron A: Induction of the mesoderm and primordial germ cells by the endoderm of *Pleurodeles waltii* (Amphibia, Urodele): development during gastrulation. *C R Acad Sci Série D* 284:1713–1716 (1977a).
- Maufroid JP, Capuron A: Recent researches on primordial germ cells of *Pleurodeles waltii* (Amphibia, Urodele). *Mem Soc Zool Fr* 41: 43–60 (1977b).
- Maufroid JP, Capuron AP: A demonstration of cellular interactions during the formation of mesoderm and primordial germ cells in *Pleurodeles waltii*. *Differentiation* 29:20–24 (1985).
- Nieuwkoop PO: Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells, and on the development of the lateral plates and germ ridges in Urodeles. *Arch Neerl Zool* 8:1–205 (1947).
- Pask AJ, Behringer RR, Renfree M: Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis – from marsupials to mice. *Cytogenet Genome Res* 101:229–236 (2003).
- Piferrer F, Blazquez M: Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem* 31:215–226 (2005).
- Ponglikitmongkol M, White JH, Chambon P: Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J* 9:2221–2231 (1990).
- Ross AJ, Tilman C, Yao H, MacLaughlin D, Capel B: AMH induces mesonephric cell migration in XX gonads. *Mol Cell Endocrinol* 211:1–7 (2003).
- Smith LD: A test of the capacity of presumptive somatic cells to transform into primordial germ cells in the Mexican axolotl. *J Exp Zool* 156:229–242 (1964).
- Tiffouche C, Chesnel A, Jégo P, Le Pennec JP: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a *Pleurodeles* lectin. *Eur J Biochem* 213:901–907 (1993).
- Vigier B, Forest MG, Eychenne B, Bezard J, Garrigou O, Robel P, Josso N: Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3684–3688 (1989).
- Wu KH, Tobias ML, Thornton JW, Kelley DB: Estrogen receptors in *Xenopus*: duplicate genes, splice variants, and tissue-specific expression. *Gen Comp Endocrinol* 133:38–49 (2003).
- Zaborski P: Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and H-Y antigen expression in gonads of a newt. *Prog Clin Biol Res* 217A:163–169 (1986).

VI.3 Régulation transcriptionnelle d'ER α et sensibilité d'ER α aux hormones stéroïdiennes

Au sein de la séquence promotrice d'ER α clonée, la recherche des éléments de réponse a été effectuée par les logiciels Motif Research (<http://motif.genome.jp/>) et MatInspector (<http://www.genomatix.de/>). Les éléments correspondant à de nombreux facteurs impliqués dans la différenciation du sexe chez les différentes classes de vertébrés sont présents. Il est donc intéressant de déterminer les facteurs susceptibles de réguler l'expression d'ER α et d'intervenir dans la différenciation ovarienne chez le pleurodèle. Dans cette optique, nous avons réalisés des expériences de mutagenèse puis des transfections ont été réalisées dans divers types cellulaires.

VI.3.1 Matériels et méthodes

- Cultures cellulaires

Les cellules MCF7 dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal et 5% d'antibiotiques, et les cellules K562, LNCaP et DU145 (DSMZ) dans un milieu RPMI sont cultivées dans un incubateur à 37°C fournissant 5% de CO₂. Après amplification, les cellules LNCaP et DU145 sont ensuite mises dans un milieu contenant du sérum de veau foetal Charcoal (Abcys Biowest) pendant deux jours avant de procéder aux transfections. A chaque passage ou après transfection, les cellules adhérentes sont lavées avec du tampon PBS1X, trypsinées, récoltées et comptées.

- Transfections

La transfection des cellules MCF7 est effectuée avec 500ng d'ADN plasmidique et 6

équivalents d'EXGEN 500 (Fermentas) avec 120,000 cellules en présence de 50ng de plasmide pCMV-βGal pendant 4 heures. Après la lyse des cellules, les mesures des activités luciférase et galactosidase sont effectuées.

Les souches K562, LNCaP et DU145 ont été transfectées par électroporation (Gene Pulser Xcell Electroporation System, Bio-Rad), à raison de 15μg de différents plasmides et de 5μg de pRL-rénilla luciférase (Promega) pour $3,75 \times 10^6$ cellules dans le milieu de culture. Le témoin positif de l'expérience est le plasmide pGL3-contrôle. Les plasmides sont tous préparés avec un kit d'extraction (Plasmide DNA purification, Macherey-Magel). Ces cellules adhérentes sont transfectées avec un courant de 250V et 975μF de capacité. Trois électroporations de chaque construction ont été réalisées, les cellules sont ensuite rassemblées dans une boîte de culture et cultivées pendant une journée pour les K562 et 2 jours pour les cellules cancéreuses de prostate. Les mesures d'activité firefly et rénilla sont réalisées à partir de $7,5 \times 10^4$ cellules (Dual-Glo™ Luciferase Assay System, Promega), 4 mesures étant réalisées pour chaque construction.

- Mutagenèse

Les amorces de 40 nucléotides (Eurogentec) portant les mutations sont désignées en remplaçant les nucléotides jusqu'à ne générer plus aucun élément de réponse. Les amorces sont désignées de façon à éviter la complémentarité au niveau des séquences (ce qui est contraire à la stratégie du fournisseur Stratagène). En effet, les amorces portent les mutations à l'extrémité 5', et 30 nucléotides correspondant à la séquence sauvage adjacente sont rajoutés en 3'.

Les PCR sont effectuées avec 1 unité de Platinum Pfx ADN polymérase (Invitrogen) avec le mélange suivant : Tampon 10X 5μl, dNTP 10mM 1,5μl, MgSO₄ 50mM 1μl, amorce 1 10μM 1,5μl, amorce 2 10μM 1,5μl, H₂O et plasmide natif 100ng. Après un cycle de dénaturation et d'activation de l'ADN polymérase 5 minutes à 94°C, 25 cycles de PCR

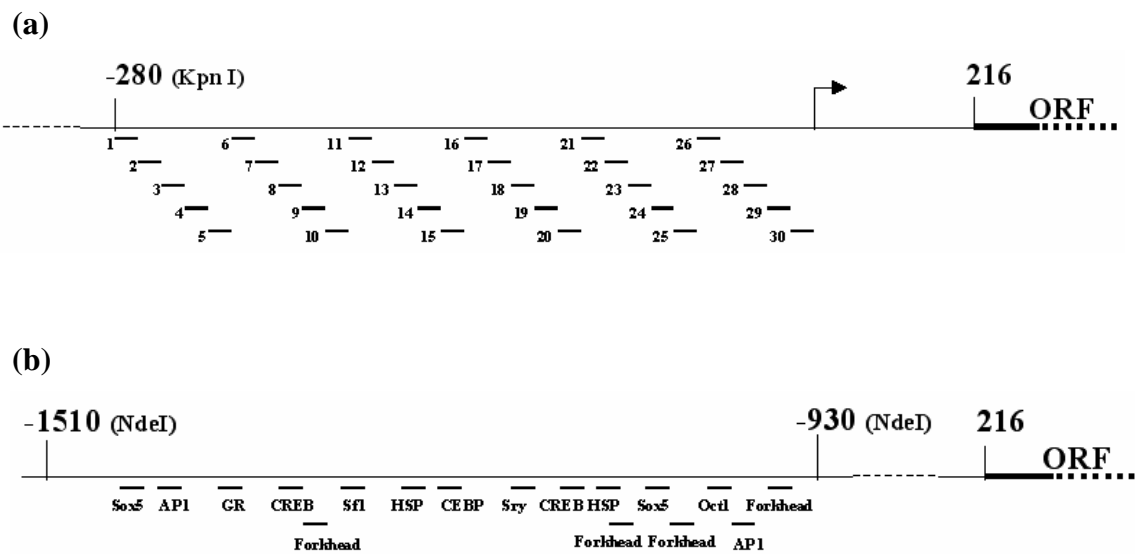


Figure VI-6. Localisation des mutations réalisées. (a) Mutations successives de 10 paires de bases situées dans le fragment -280pb à $+1$ du promoteur d' $\text{ER}\alpha$. (b) Mutations des sites de liaison de facteurs connus pour intervenir dans la différenciation du sexe chez les vertébrés.

comprenant la dénaturation (30 secondes à 94°C), l'hybridation (30 secondes à la température d'hybridation optimale des amorces) et l'élongation (6 minutes à 68°C) sont répétés.

Après purification des produits de PCR (QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen), la totalité de l'ADN récupéré est incubée avec 40 unités d'enzyme de restriction DpnI (BioLabs) à 37°C pendant deux heures. Après incubation, le mélange est purifié puis dosé, et entre 40 et 50ng de l'ADN purifié sont transformés dans la souche bactérienne X-blue 1 (Stratagène) qui contient une ligase endogène. Les bactéries sont remises en culture, et les préparations de plasmide sont effectuées. L'introduction des mutations est vérifiée par séquençage (GATC).

VI.3.2 Implication du facteur CTCFL/BORIS dans la régulation de l'expression d'ER α de pleurodèle

Afin d'identifier la zone impliquée dans la régulation transcriptionnelle d'ER α de pleurodèle, les différentes parties de ce fragment promoteur ont été premièrement sous-clonées dans le plasmide rapporteur pGL3-basic, en enlevant certains éléments de réponse précédemment identifiés. La figure VI-5 montre les différents sous-clones réalisés. La localisation de la base +1 a été obtenue par RACE-PCR à partir d'ARN messagers de testicules juvéniles. Un premier test de l'activité promotrice a été réalisé dans les cellules MCF7 (Ko *et al.*, 2008) et K562, cette dernière ne devant pas être influencée par la présence des hormones sexuelles. L'activité promotrice de ces différentes parties a été ensuite mesurée dans les cellules cancéreuses de prostates humaines : LNCaP (lignée androgène-dépendante) et DU145 (lignée androgène-indépendante) ; ce sont des lignées cellulaires où l'expression des gènes pourrait éventuellement être influencée par les hormones sexuelles.

Les mutagenèses dirigées ont été ensuite réalisées sur les fragments donnant une activité promotrice plus élevée par rapport au promoteur cloné entier (Fig. VI-6). L'activité promotrice de ces constructions mutantes est aussi mesurée dans les cellules de prostate en comparant avec le fragment original afin d'identifier les éléments de réponse impliqués.

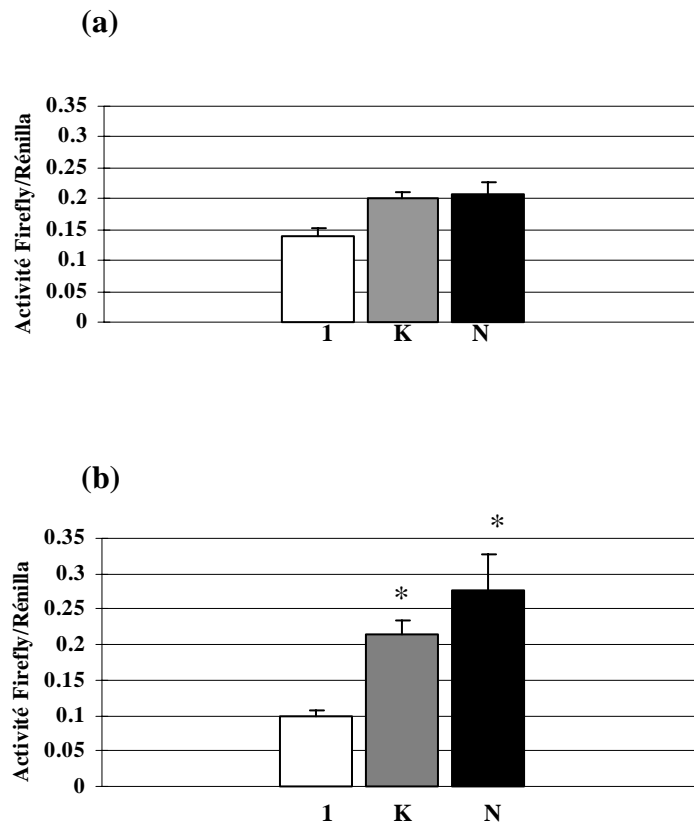


Figure VI-7. Activité promotrice de différentes constructions du promoteur d'ER α de pleurodèle. Les cellules cancéreuses de prostate DU145 (a) et LNCaP (b) ont été transfectées avec des plasmides où la firefly luciférase a été placée en aval d'un fragment promoteur de l'ER α natif pER1 (1) ou délété pER Δ KpnI (K) et pER Δ NdeI (N). L'échelle montre le rapport entre firefly luciférase et rénilla, unités arbitraires. * Différence significative par rapport à la construction pER1.

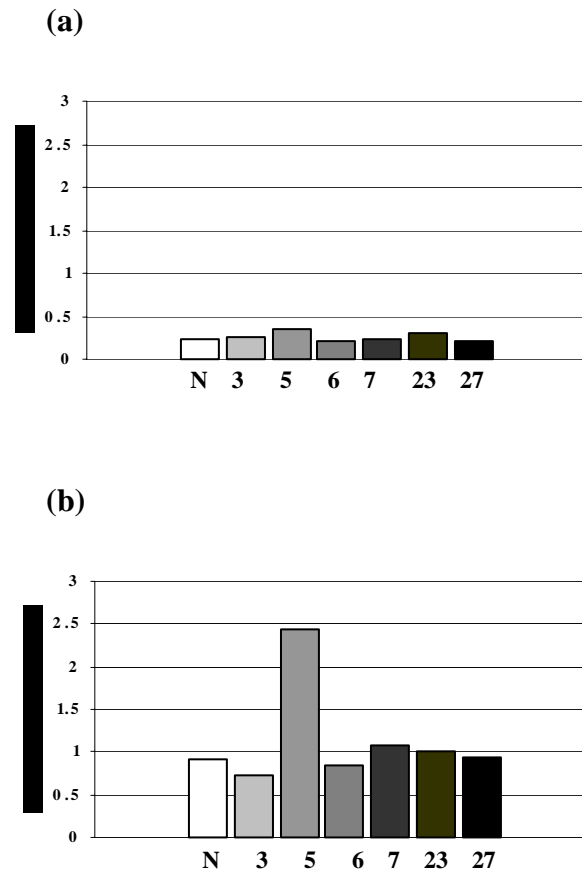


Figure VI-8. Effet de différentes mutations sur l'activité du promoteur de l'ER α de pleurodèle dans les cellules cancéreuses de prostate : DU145 (a) et LNCaP (b). L'échelle montre le rapport de firefly luciférase à la rénilla, unités arbitraires. Construction pER Δ NdeI (N) ; numérotations des constructions mutées correspondent à celles montrées dans la figure VI-6.

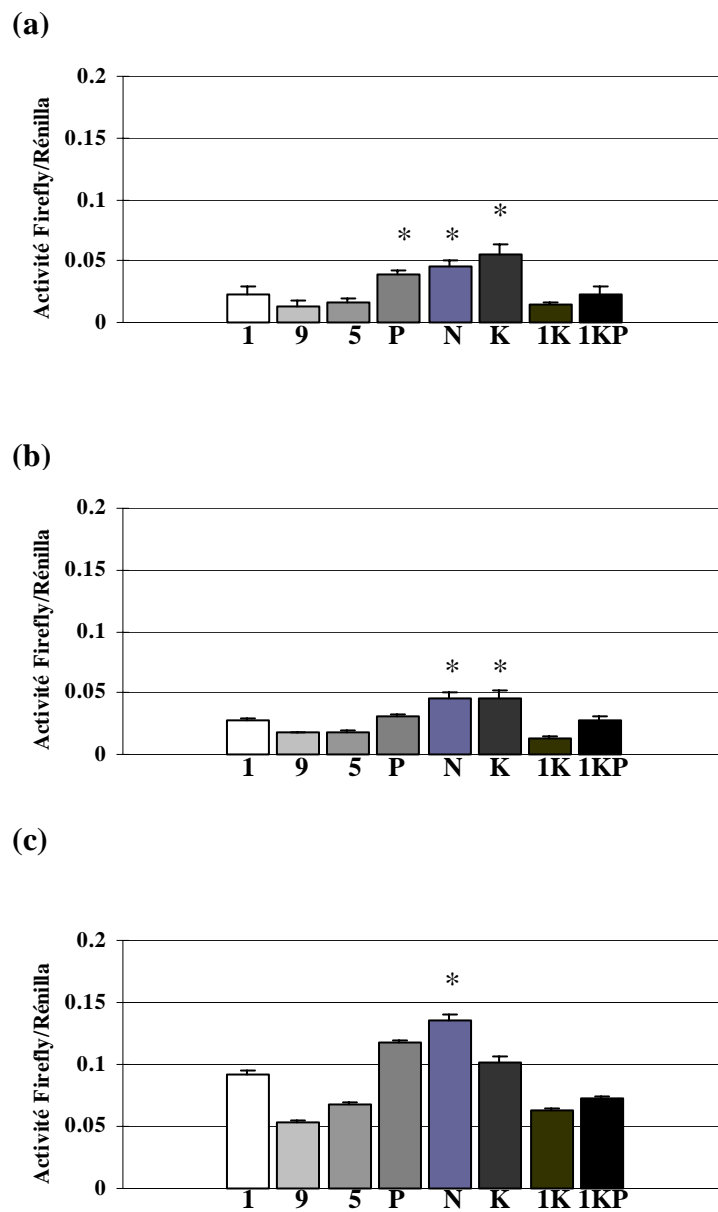


Figure VI-9 Activité promotrice de différents fragments promoteurs de l'ER α de pleurodèle dans les cellules de leucémie K562 (a) et les cellules cancéreuses de prostate DU145 (b) et LNCaP (c). Constructions : pER1 (1), pER930 (9), pER550 (5), pER Δ PvuII (P), pER Δ NeI (N), pER Δ KpnI (K), pER1120 (1K) et pER1120 Δ PvuII (1KP) ; ces constructions sont présentées dans la figure VI-5. * Différence significative par rapport à la construction pER1.

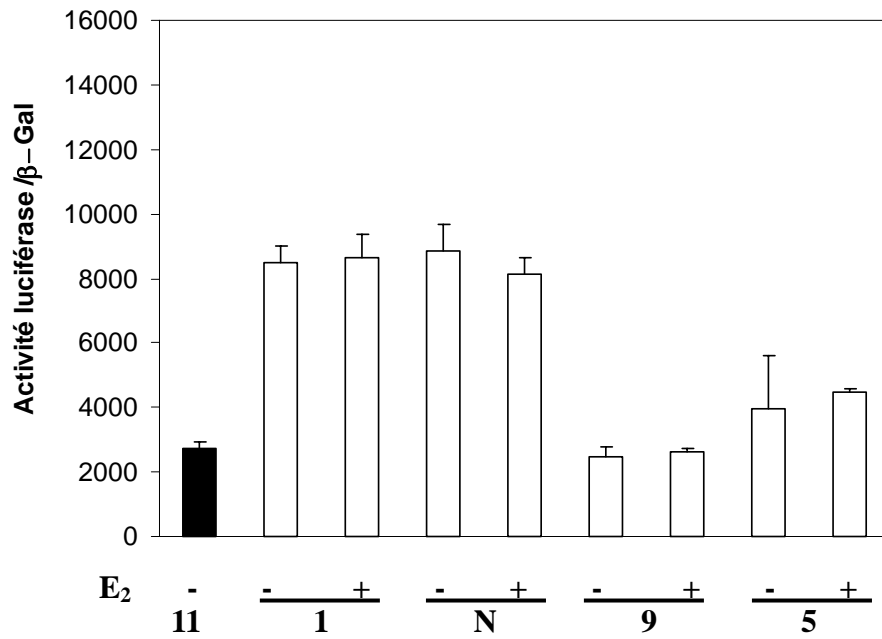


Figure VI-10 Activité promotrice de différents fragments promoteurs de l'ER α de pleurodèle dans les cellules de MCF7. Constructions : pER11 (11), pER1 (1), pER930 (9), pER550 (5), pER Δ NeI (N) ; ces constructions sont présentées dans la figure VI-5.

Dans les cellules cancéreuses de prostate, les constructions pER Δ KpnI et pER Δ NdeI donnent une activité promotrice plus élevée par rapport à celle de la construction comportant le promoteur entier (Fig. VI-7). Ces activités promotrices indiquent que les éléments de réponse se situent entre le site de restriction KpnI et la base +1. En revanche, les éléments de réponse liés aux protéines inhibitrices pourraient exister dans la zone située entre les deux sites de restriction NdeI (Fig. VI-5).

Par la suite, les mutagenèses ont été réalisées dans la zone de -280pb à +1 (Fig. VI-6a) et dans le fragment situé entre les deux sites de restriction NdeI (Fig. VI-6b). Les constructions mutées sont ensuite testées par transfection. La figure VI-8 montre les effets de ces mutations sur l'activité promotrice d'ER α . Dans les cellules DU145, il n'y a pas de changement d'activité à l'issue de ces mutations. Par contre, dans les cellules LNCaP, la mutation 5 montre une activité plus élevée par rapport à la construction pER Δ NdeI, et un facteur de transcription appartenant à la famille CTCFL/BORIS est identifié. Cette zone du promoteur présente aussi beaucoup de sites CpG qui pourraient être soumis à la méthylation de l'ADN. Ce facteur pourrait avoir une influence inhibitrice sur la régulation de l'expression d'ER α puisque la mutation de son élément de réponse montre une activité promotrice augmentée.

En revanche, les constructions dépourvues de la région 5'UTR (pER930, pER550, pER1120 et pER1120 Δ pvuII, Fig. VI-5), montrent des activités promotrices basses par rapport au promoteur entier (pER1, Fig. VI-5, VI-9 et VI-10). Des éléments de réponse ayant des influences inhibitrices pourraient aussi exister dans la région 5'UTR. En effet, cette région est riche en cystéine qui pourrait constituer un îlot CpG, et l'implication de la méthylation de l'ADN pour la régulation de l'expression d'ER α pourrait avoir lieu.

VI.3.3 Expression d'ER α et de l'aromatase sous l'influence des hormones stéroïdiennes

Une construction promotrice avec deux demi-ERE et un site AP1 est suffisante pour

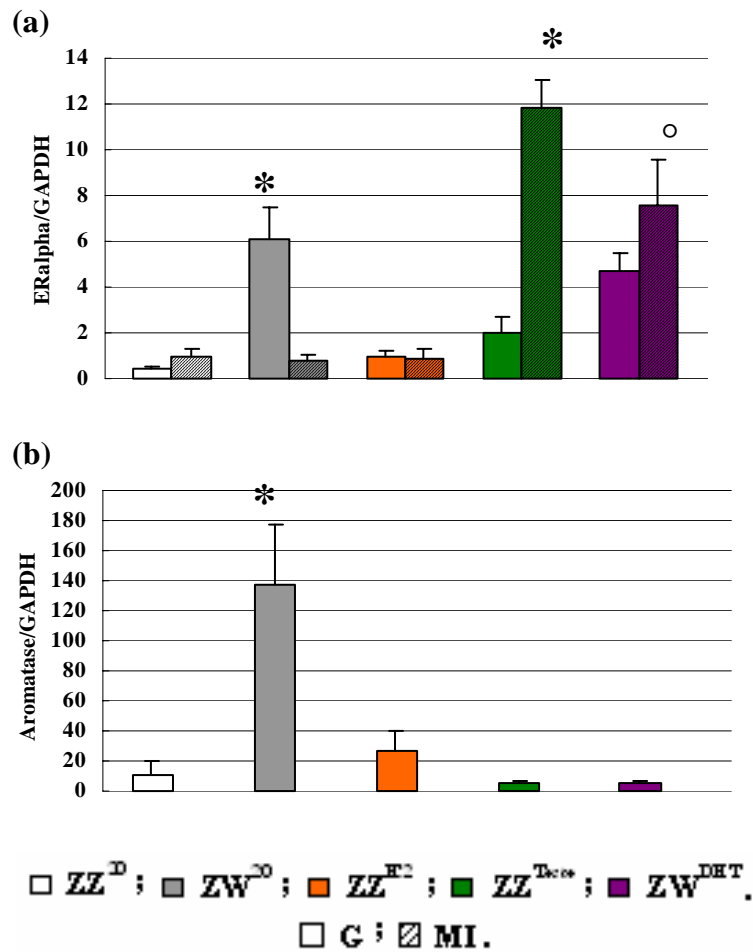


Figure VI-11. Analyse par PCR en temps réel de l'expression de l'ER α (a) et de l'aromatase (b) au cours de la différenciation gonadique chez *Pleurodeles waltl* au stade 54^{30d}. A ce stade, les analyses ont été réalisées sur les gonades (G) et le complexe mésonéphros-organe interrénal (MI) séparément. * Différence significative par rapport au mâle ZZ²⁰. ° Différence significative par rapport à la femelle ZW²⁰.

activer l'activité promotrice oestrogène-dépendante (Ponglikitmongkol *et al.* 1990). Chez le xénope, l'expression de la vitéllogénine peut être activée par cette construction (Chang *et al.* 1992). Chez le poisson zèbre et le xénope, les oestrogènes sont capables d'effectuer un rétrocontrôle de l'expression d'ER α *via* les sites demi-ERE (Lee *et al.* 1995; Menuet *et al.* 2004). Chez le pleurodèle, les éléments de réponse notamment les sites AP1 (activating protein 1) et les demi-ERE (estrogen receptor element) sont présents dans le promoteur d'ER α , suggérant que la régulation de l'expression d'ER α par les hormones stéroïdiennes est possible.

L'expression d'ARN messager d'ER α a été analysée au cours d'inversions sexuelles provoquées par l'oestradiol, la testostérone et la DHT. Des larves ZZ élevées dans de l'eau contenant 100 μ g/L d'oestradiol (ZZ^{E2}) se différencient en femelles ; de même la testostérone à 500 μ g/L (ZZ^{Testo}) entraîne une inversion paradoxale des larves ZZ en femelles, tandis que la DHT, non-aromatisable, à 400 μ g/L (ZW^{DHT}) provoque l'inversion des larves ZW en mâles. Les traitements ont été réalisés à partir du stade 52 et les analyses de l'expression par PCR en temps réel d'ER α et de l'aromatase ont été réalisées au stade 54^{30d} (Fig. VI-11).

L'oestradiol entraîne dans les gonades de larves ZZ une légère augmentation de l'expression des ARN messagers de l'aromatase et d'ER α (2,3x et 2,1x respectivement). Les traitements avec les androgènes (testostérone et DHT) n'induisent aucune augmentation de l'expression de l'aromatase. Bien que la testostérone entraîne une féminisation paradoxale des larves ZZ, l'expression de l'aromatase reste faible dans les gonades. La DHT provoque une forte inhibition de l'expression de l'aromatase dans les gonades des larves ZW conformément à un effet masculinisant. En revanche, pour ER α , les androgènes ont des effets très variés. Dans les gonades, l'expression des ARN messagers dans les larves traitées (ZZ^{Testo} et ZW^{DHT}) est similaire à celle des larves témoins. En revanche, dans le mésonéphros, il y a une très forte augmentation du taux de messager d'ER α aussi bien dans les larves ZZ traitées par la testostérone (12,81x par rapport aux larves ZZ²⁰) que dans les larves ZW traitées par la DHT (10,27x par rapport aux larves ZW²⁰).

Les hormones stéroïdes n'ont pas d'effet significatif sur l'expression d'ARN messenger d'ER α dans les gonades. A ce stade, l'expression transcriptionnelle d'ER α n'est peut-être pas régulée par les hormones stéroïdes. Cependant l'influence de l'expression d'ER α au niveau traductionnel par ces hormones stéroïdiennes pourrait avoir lieu. En revanche, dans les mésonéphros, les androgènes provoquent une forte augmentation de l'expression d'ER α . Comme les mésonéphros sont reliés avec les canaux de Wolff à ce stade (54^{30d}), il est possible que les androgènes stimulent la prolifération cellulaire et l'hypertrophie comme ce qui est décrit chez la salamandre *Ambystoma ambystoma* (Clark *et al.* 1998).

VI.4 Récepteur des androgènes (AR) et sa sensibilité aux hormones stéroïdiennes chez le pleurodèle

Les mécanismes d'action des androgènes restent inconnus aussi bien chez le pleurodèle que chez les autres amphibiens. Les traitements des larves d'amphibiens par des androgènes ont donné des résultats extrêmement variables selon les espèces et les stéroïdes utilisés (Hayes 1998). Chez le pleurodèle, la testostérone exerce un effet paradoxal (féminisation des larves ZZ). L'effet de la testostérone est compliqué puisque c'est un précurseur, à la fois pour des androgènes (la DHT) et aussi pour des oestrogènes (l'oestradiol) *via* les réactions enzymatiques de la 5 α -réductase et de l'aromatase respectivement. En revanche, les stéroïdes non aromatisables comme la DHT et la 11 β -hydroxyandrostenedione masculinisent les larves ZW. La DHT possède une affinité pour l'AR plus forte que celle de la testostérone (Zhou *et al.* 1995b). Afin de préciser les effets des androgènes chez le pleurodèle, nous avons, en parallèle des travaux sur ER α , mené les mêmes expériences sur le récepteur des androgènes.

VI.4.1 Isolement du cDNA du récepteur des androgènes

Comme pour ER α , la technique de PCR dégénérée a été utilisée pour isoler un premier

Manipulation	Nom de l'amorce	Séquence 5' à 3'
RACE-PCR	AR3R	5'- GGGAGAGCGACAGCTGGTGCACGTG -3'
	AR3R2	5'- CAGTATTCGTGGATGGGGCTG -3'
PCR classique	ARup	5'- TTGGGAGCCCGGAAGCTAAA -3'
	Ardw	5'- AGCCCCATCCACGAATACTG -3'
PCR en temps réel	ARq-dir2	5'-TCAGTTTACCTTCGACCTCTTCG-3'
	ARq-rev2	5'-TGGGCTTACTCTTCCAGATAGG-3'
Production d'anticorps	antiAR-1	5'-AAGATCCAAGGATCCGGTGAAGCAGCAAAATCACCA-3'
	antiAR-2	5'-GTCCGGCTGAAGCTTCAATGGCCGGCGCAAACAACAAT-3'

Tableau VI-1. Amorces utilisées lors de différentes PCR du récepteur des androgènes. Les sites de restriction BamHI et HindIII sont soulignés.

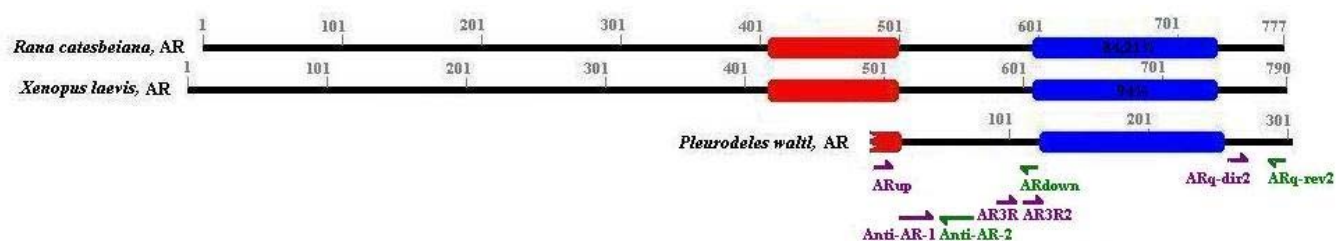
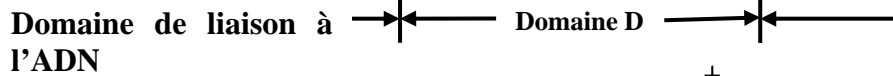


Figure VI-12. Schéma de la séquence d'AR de pleurodèle. Les positions des amorces utilisées lors des PCR sont indiquées. Le domaine de liaison à l'ADN est marqué en rouge et celui de liaison au ligand en bleu.

Homme	DEASGCHYGALTCGSCKVFFKRAAEGKQKYL CASRNDCTIDKFRRNKNCPSCLLRKCYEAG	624
Souris	DEASGCHYGALTCGSCKVFFKRAAEGKQKYL CASRNDCTIDKFRRNKNCPSCLLRKCYEAG	603
Poulet	-----MKSSKGKQKYL CASRNDCTIDKFRRNKNCPSCLLRKCYEAG	40
Xénope	DEASGCHYGALTCGSCKVFFKRAAEGKQKYL CASRNDCTIDKFRRNKNCPSCLLRKCYEAG	493
Pleurodèle	-----CYEAG	5

Homme	MTLGARKLKKLGNLKLQEEGEASSTTSPT---ETTQKLTVSHIEGYECQPIFLNVLEAI	681
Souris	MTLGARKLKKLGNLKLQEEGENSNAGSPT---DPSQKMTVSHIEGYECQPIFLNVLEAI	660
Poulet	MTLGARKLKKLGLKQDEAEAASSSSPT---EQAPKMVMTHVNGFECQPIFLNVLEAI	97
Xénope	MTLGARKLKKLGNLKAQEELDSSVQGEKS--KELSPGMGIPQLEGYSCQPIFLNVLEAI	551
Pleurodèle	MTLGARKLKKLGNLKIQEEGEAAKSPNNGDSMQEQSSMLGLSHLENFN SQPIFLNVLEAI	65



Homme	EPGVVCAGHDNNQPD SFAALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYS	741
Souris	EPGVVCAGHDNNQPD SFAALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYS	720
Poulet	EPAVVCAGHDNSQPD SFSNLLSSLNELGERQLVYVVKWAKALPGFRNLHVDDQMSIIQYS	157
Xénope	EPVVCAGHDNNQPD SFAALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVSDQMTVIQYS	611
Pleurodèle	EPIVVCAGHDNNQPD TFAALLTSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFPNLHVNDQMTIIQYS	125

Homme	WMGLMVFAMGWR SFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSRMYSQCVRMRHLSQEFGLQIT	801
Souris	WMGLMVFAMGWR SFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSRMYSQCVRMRHLSQEFGLQIT	780
Poulet	WMGLMIFAMGWR SFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSRMYSQCVRMRQLSQEFGLQIT	217
Xénope	WMGLMIFAMGWR SFKNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSRMYSQCVR LRHLSQEFGLQIT	671
Pleurodèle	WMGLMVFAMGWR SFKTVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSRMYSQCVR LRHLSQEFGLQIT	185

Domaine de liaison au ligand

Homme	PQEF LCMKALLFSIIPVDGLKNQKFFDEL RMNYIKELDR IACKRKNPTSCSRRFYQLT	861
Souris	PQEF LCMKALLFSIIPVDGLKNQKFFDEL RMNYIKELDR IACKRKNPTSCSRRFYQLT	840
Poulet	PQEF LCMKALLFSIIPVDGLKNQKFFDEL RMNYIKELDR IACKRKNPTSCSRRFYQLT	277
Xénope	PEEF LCMKALLFSIIPVEGLKDQKCFDEL RMNYIKELDR VISCKRNNPASSRRFFQLT	731
Pleurodèle	TEEF LCMKALLFSIIPVEGLKNQKCFDEL RRLNYIKELDR VIACKRANPASSRRFYQLT	245

Homme	KLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSHMVSVD FPEMMAE IISVQVPKILSGKVKPIYFHTQ	920	83%
Souris	KLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSHMVSVD FPEMMAE IISVQVPKILSGKVKPIYFHTQ	899	83%
Poulet	KVLD SVHPIAKDLHQFTFDLLIKAHMVSVD YPEMMAE IISVQVPKILSGKVKPIYFHA E	336	78%
Xénope	KLLDSVQPIARELHQFTFDL FVKAQMVSD YPEMMSE IISVQVPKILSGRVKPLYFHIS	790	85%
Pleurodèle	KLLDSVQPIARELHQFTFDL FAKAQMVSD FPEMMAEMVSQVPKILSGRVKPIFFHSL	304	100%

Domaine F

Figure VI-14. Alignement des séquences protéiques d'AR entre différentes espèces de vertébrés. Les acides aminés conservés chez *Pleurodeles waltl* sont marqués en gris. Les % d'identités sont indiqués. Les positions des introns, déduites de la comparaison des séquences de mammifères, sont marquées par les triangles noirs.

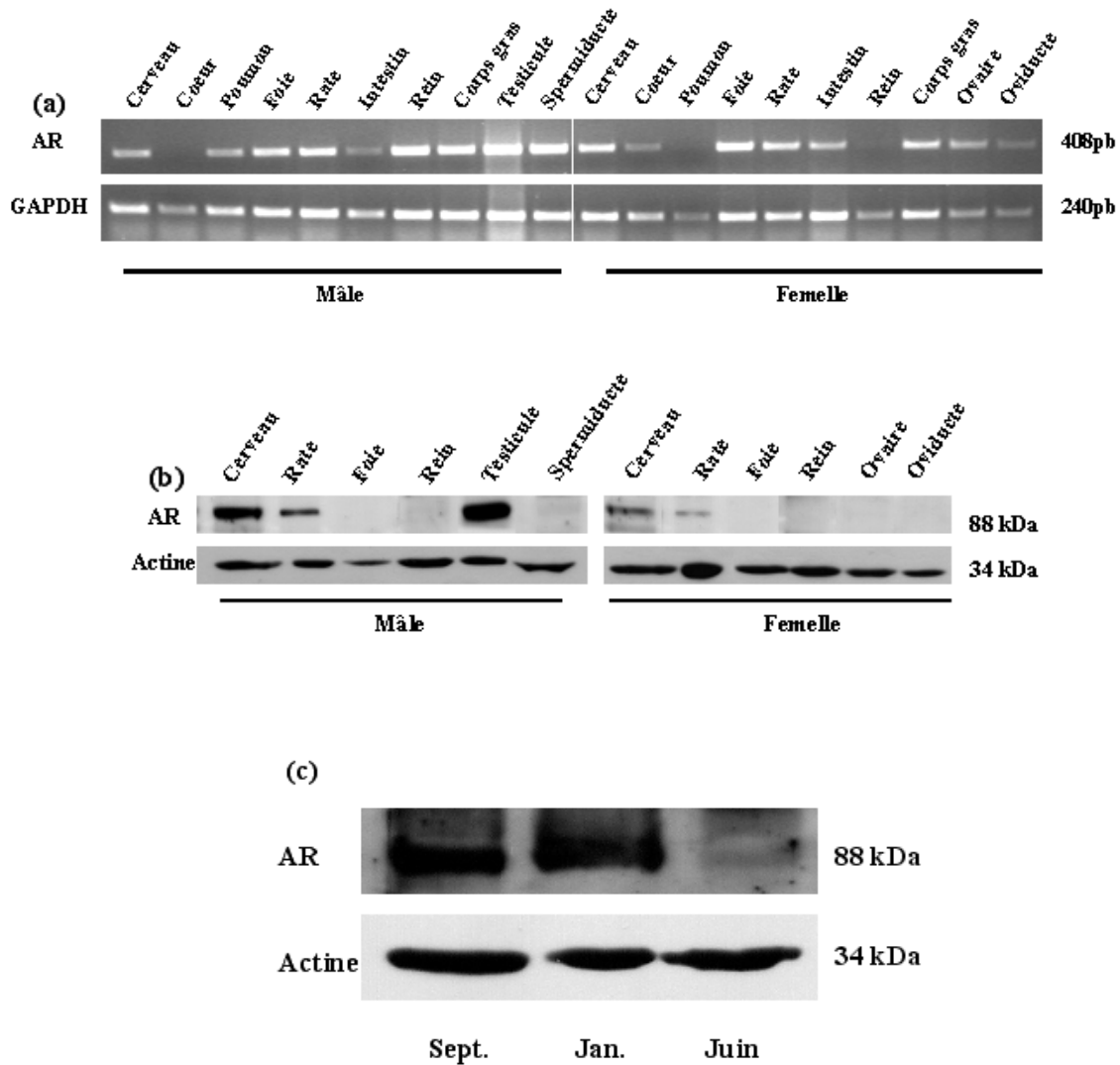


Figure VI-15. Expression d'AR dans différents tissus adultes chez *Pleurodeles waltl*. (a) Analyse au niveau des ARN messagers par RT-PCR ; (b) analyse au niveau protéique par Western Blot ; (c) Détection d'AR par western blot dans l'oviducte à différentes périodes de l'année. L'actine est utilisée comme protéine de référence. Sept. – septembre, Jan. – janvier.

fragment de l'ADNc du récepteur des androgènes. D'après un alignement des séquences protéiques d'autres vertébrés, des amorces dégénérées ont été choisies dans le domaine de liaison à l'ADN et dans le domaine de liaison au ligand (Fig. VI-12). Un fragment d'ADNc de 408pb a ainsi été obtenu. Nous avons ensuite utilisé la technique de RACE-PCR pour cloner le reste de l'ADNc. Les amorces AR3R et AR3R2 (Tableau VI-1) nous ont permis d'isoler une extrémité 3' de 1232pb. Malgré de nombreuses tentatives, les RACE du côté 5' ont échoué. Le côté 5' du gène AR est très long, les répétitions de Glutamine et le fragment riche en sérine sont présents dans les séquences protéiques d'AR d'autres espèces. Au total, la séquence obtenue contient une séquence codante de 942pb et une 3'UTR de 698pb possédant plusieurs sites de polyadénylation (Fig. VI-13).

L'alignement de la séquence protéique déduite avec les séquences protéiques d'AR d'autres vertébrés montre 85% d'identité avec la séquence du xénope, 78% avec celle du poulet et 83% avec les séquences de l'homme et de la souris (Fig. VI-14).

VI.4.2 Expression du récepteur des androgènes chez le pleurodèle

Après avoir cloné le cDNA, l'expression d'AR a été analysée au niveau de l'ARN messager par hybridation *in toto* et PCR en temps réel, et au niveau protéique par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal produit avec les protéines recombinantes.

-Dans les tissus adultes

Nous avons étudié l'expression d'AR par RT-PCR dans les différents tissus adultes de mâle et de femelle (amorces ARup et ARdown, Tableau VI-1). La figure VI-15a montre une expression ubiquitaire d'ARN messager d'AR dans les différents tissus.

Au niveau protéique, l'AR est détecté dans le cerveau et la rate chez les mâles et les femelles ainsi que dans le testicule (Fig. VI-15b). L'expression de l'AR dans le cerveau

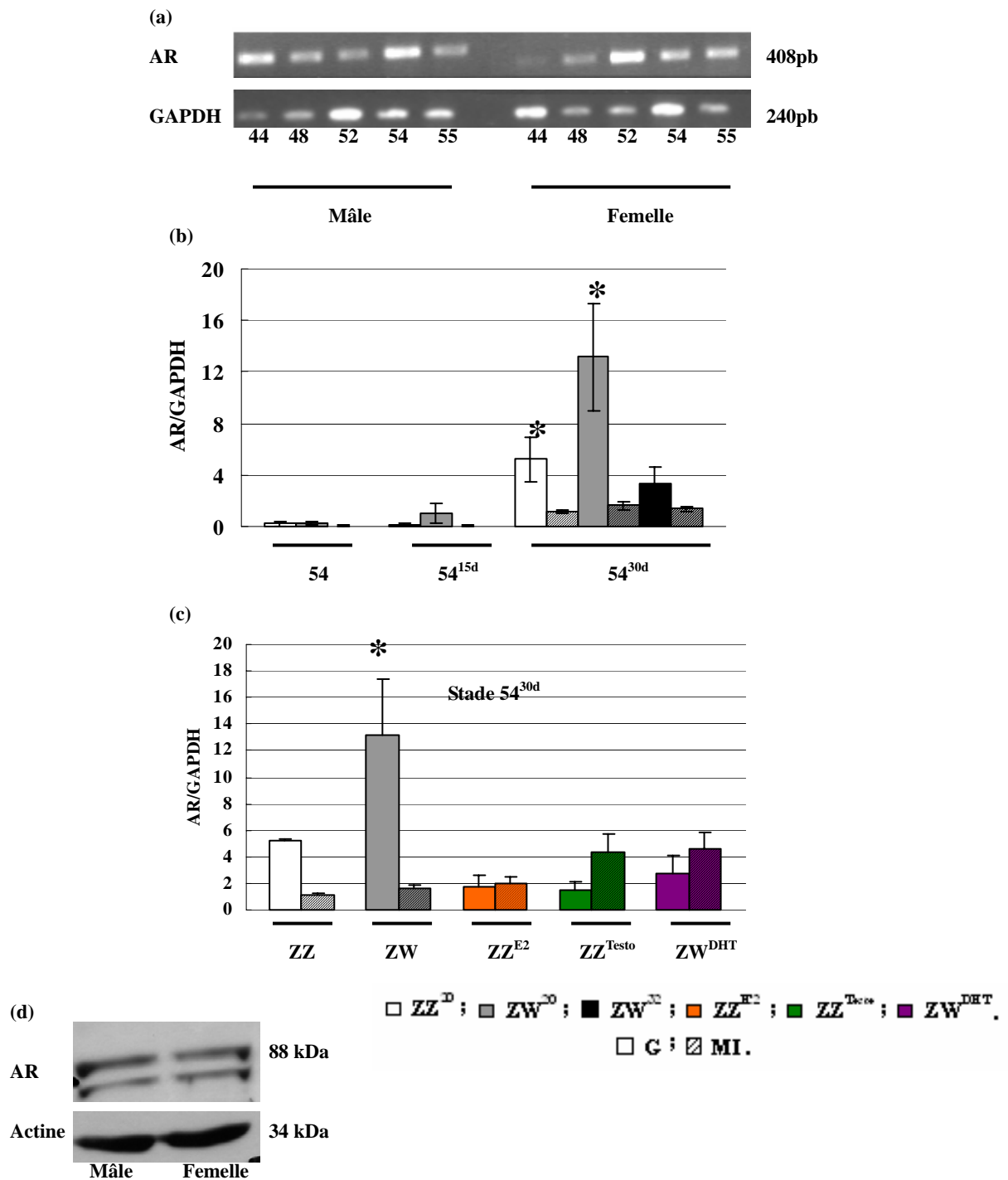


Figure VI-16. Expression d'AR au cours de la différenciation gonadique chez *Pleurodeles waltl*. Les analyses par PCR en temps réel ont été réalisées en triplicate sur 5 pools de 4 complexes GMI aux stades 54 et 54^{15d} et 5 pools de 4 G ou MI au stade 54^{30d}. (a) Expression d'AR des stades 44 à 55. (b) Expression d'AR aux stades 54, 54^{15d} et 54^{30d} chez les larves ZZ et ZW élevées à 20°C et chez les larves ZW élevées à 32°C. (c) Effet des hormones stéroïdiennes sur l'expression d'AR au stade 54^{30d}. (d) Expression d'AR au stade 54^{30d} en western blot, l'analyse a été effectuée sur 1 pool de 10 GMI. GMI – complexe gonade-mésonephros-organe interrénal ; G – gonade ; MI – mésonephros-organe interrénal. * Différence significative parmi les échantillons analysés.



Figure VI-17. Détection de l'expression de l'AR par hybridation *in toto* sur des complexes GMI de larves ZZ²⁰ (a et c) et ZW²⁰ (b et d) aux stades 54^{15d} (a et b) et 54^{30d} (c et d). MI – mésonéphros-organe interrénel ; G – gonade ; cg – corps gras (tissu adipeux associé aux gonades).

pourrait suggérer un rôle dans la sexualisation cérébrale tandis que l'expression dans le testicule est bien en accord avec le rôle des androgènes dans la spermatogenèse. En revanche, nous n'avons pas d'explication pour l'expression dans la rate. Il est à noter que la protéine AR est aussi présente dans l'oviducte. Cette expression varie selon la saison : la protéine AR est détectée pendant la période de reproduction qui s'étale de septembre à mars (Fig. VI-15c) tandis qu'elle n'est pas ou peu exprimée en dehors de cette période (Fig. VI-15b et c). Une telle variation d'expression n'a pas été observée pour d'autres organes comme le testicule, l'ovaire ou le spermiducte.

- Au cours de la différenciation gonadique

Au cours de la vie larvaire, l'expression d'ARN messenger d'AR débute de façon très précoce puisque par RT-PCR, les ARN messagers sont détectés dès le premier stade étudié, le stade 44 (Fig. VI-16a).

Les analyses quantitatives du taux d'ARN messenger ont été réalisées par PCR en temps réel du stade 54 au stade 54^{30d}, soit au début de la différenciation sexuelle des gonades (Fig. VI-16b). Au stade 54, l'expression d'AR est faible et ne montre aucune différence entre larves mâles et larves femelles. Cette expression augmente ensuite dans les larves ZW au stade 54^{15d} et surtout au stade 54^{30d}. A ce stade, où l'on peut séparer les gonades du mésonéphros, l'expression d'AR est significativement plus forte dans les futurs ovaires que dans les futurs testicules (2,52x). Dans le mésonéphros, l'expression d'AR reste faible et identique dans les deux sexes. Ceci est confirmé par les études d'hybridation *in toto*, où au stade 54^{30d}, un signal est détecté dans les gonades chez les femelles tandis que chez les mâles le signal est très faible (Fig. VI-17). En revanche, les premiers western blot réalisés sur un pool de 10 complexes gonade-mésonéphros-organe interrénal ne montrent aucune différence dans le taux de protéines AR entre les larves ZZ et ZW au stade 54^{30d} (Fig. VI-16d).

Lors de l'élevage à 32°C des larves ZW, la température semble avoir un effet inhibiteur

sur l'expression transcriptionnelle d'AR (Fig. VI-16b), ce résultat est en accord avec la différenciation femelle qui s'accompagne d'un taux plus élevé des messagers d'AR.

Enfin, nous avons étudié l'effet de traitements par des stéroïdes entraînant une inversion sexuelle, sur le taux d'ARN messager d'AR. L'analyse a été réalisée au stade 54^{30d} lors de traitements de larves ZZ par l'oestradiol ou par la testostérone (différenciation en femelle sous l'effet gynogène de l'oestradiol ou sous l'effet paradoxal de la testostérone) et lors d'un traitement de larves ZW par la DHT (différenciation en mâles). Les traitements entraînent des profils d'expression similaires aussi bien dans les gonades que dans les mésonéphros (Fig. VI-16c). La DHT provoque, comme la température, une baisse de l'expression d'ARN messager dans les gonades. En revanche les traitements entraînant la différenciation femelle ne provoquent pas dans les gonades de larves ZZ d'augmentation de l'expression d'AR, ce qui est paradoxal par rapport à l'effet de la température et ce qui se passe dans une différenciation femelle normale. Cependant les mécanismes d'action de l'effet de la température et celui des hormones stéroïdiennes pourraient être différents. En plus, les concentrations des hormones stéroïdiennes exogènes ajoutées ont peut-être dépassé le seuil des concentrations physiologiques chez les larves.

VII. Discussion, conclusion et perspectives

VII. Discussion, conclusion et perspectives

Le rôle des oestrogènes dans la différenciation ovarienne chez les vertébrés est maintenant bien établi. Chez les vertébrés ovipares, les oestrogènes sont produits par l'aromatase dans les gonades femelles pour engager la différenciation ovarienne (Elbrecht & Smith 1992; Guiguen *et al.* 1999; Kuntz *et al.* 2003b; Urbatzka *et al.* 2007). La présence d'oestrogènes chez les mâles (traitements des embryons ou des larves par des oestrogènes exogènes) entraîne leur inversion en femelles tandis que l'absence d'oestrogènes chez les femelles (traitements par des inhibiteurs de l'aromatase) entraîne leur inversion sexuelle en mâles (Afonso *et al.* 1999; Bhandari *et al.* 2004). Même chez la souris, la double invalidation des gènes codant les récepteurs α et β des oestrogènes empêche à partir de la maturité sexuelle le maintien de la différenciation ovarienne et provoque un début d'inversion sexuelle (Couse *et al.* 1999; Dupont *et al.* 2003). En revanche, les cibles des oestrogènes au cours de la différenciation ovarienne ainsi que les mécanismes d'activation de la production des oestrogènes, sont encore largement inconnus. Le but général de la thèse s'inscrit dans une meilleure compréhension des mécanismes de la différenciation sexuelle induite par les oestrogènes chez le pleurodèle.

Bien que le pleurodèle soit sensible aux oestrogènes – des larves ZZ traitées à l'oestradiol se différencient en femelles, l'oestradiol annule l'effet masculinisant de la température – il semble nécessaire de relativiser cette sensibilité par rapport à d'autres modèles biologiques. En effet, la dose d'oestradiol nécessaire pour inverser complètement toutes les larves ZZ est de $100\mu\text{g/L}$ ($2.7 \times 10^{-7}\text{M}$). Nos travaux montrent qu'à dose plus faible, le traitement provoque l'obtention d'intersexués. En revanche, chez le xénope, il est possible d'obtenir la féminisation complète d'une population unisexuée mâle à la dose de 0,27 ppb ($7.2 \times 10^{-10}\text{M}$) (Oka *et al.*, 2008). Le pleurodèle semble donc beaucoup moins sensible aux oestrogènes exogènes que des modèles anoures comme le xénope. Ceci est encore renforcé

par les résultats que nous avons obtenus avec les traitements par des oestrogéno-mimétiques. La plupart des molécules que nous avons testées n'ont eu aucun effet sur la différenciation sexuelle alors que le bisphénol-A et l'atrazine entraînent des déviations du sex-ratio vers le sexe femelle chez le xénope à des concentrations comparables ou inférieures à celles que nous avons utilisées (Kloas *et al.* 1999; Levy *et al.* 2004). Il est à noter cependant des résultats contradictoires obtenus chez le xénope par différentes équipes : faut-il y voir une forte variation de la sensibilité des différentes souches de xénope selon les laboratoires ? Il n'est pas exclu que, malgré l'absence d'effets sur la différenciation gonadique, l'exposition durant la vie larvaire à ces composés puisse néanmoins avoir des répercussions sur la physiologie des gonades juvéniles ou adultes. Les études au niveau des impacts du comportement sexuel et/ou de la capacité de la reproduction pourraient être envisagées.

Parmi les différentes molécules que nous avons testées ici, le seul oestrogéno-mimétique montrant un effet chez le pleurodèle est l'éthynylestradiol (EE₂). Cet œstrogène synthétique est décrit comme plus puissant que l'oestradiol (E₂) du fait notamment d'un métabolisme diminué et donc d'une durée de vie plus longue. En effet, l'EE₂ s'est montré plus efficace que l'E₂ chez le pleurodèle : la concentration nécessaire pour inverser le sexe de larves ZZ est inférieure à celle de l'E₂ (10µg/L contre 100µg/L) mais supérieure à la dose décrite comme efficace chez le xénope (Gyllenhammar *et al.* 2008).

En revanche, le développement des canaux de Müller est stimulé par une faible concentration d'oestrogènes (1x10⁻¹⁰ M aussi bien E₂ que EE₂) : ici, les hormones ne s'opposent pas à un programme génétique comme dans la gonade mâle, ce qui expliquerait le fort impact des oestrogènes sur les oviductes. Ces doses sont dans la gamme de celles susceptibles de se retrouver dans la nature (Pettersson & Berg 2007; Gyllenhammar *et al.* 2008). Le développement des oviductes chez le pleurodèle pourrait ainsi constituer un bon test *in vivo* du caractère oestrogéno-mimétique d'un composé, comme chez les mammifères, l'hypertrophie de l'utérus est aussi utilisée comme un indicateur des molécules jouant un rôle d'oestrogènes mimétiques (Yamasaki *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 2007). Ce test pourrait être

complété par la détection de l'expression d'un marqueur exprimé sous le contrôle des oestrogènes, comme la *P. waltl* lectin, la protéine majeure sécrétée par la partie antérieure de l'oviducte (Tiffoche *et al.* 1993). Des tests similaires ont été proposés dans la littérature, comme par exemple l'induction de la vitellogénine dans le foie chez le mâle dans différentes espèces (Emmerson *et al.* 1979). Il serait intéressant d'affiner le stade et la durée minimale d'exposition des larves ZZ à l'EE₂. Une exposition de 24 heures au stade 54 pourrait peut-être suffire à détecter l'expression de la lectine de l'oviducte. Ces études *in vivo* pourraient également être complétées par des études en culture organotypique. Nous avons récemment développé cette méthode pour étudier le déterminisme de l'entrée en méiose et l'effet de l'acide rétinoïque (Wallacides *et al.* unpublished). Les composés qui n'avaient pas semblé avoir d'effet sur la différenciation gonadique pourraient être réétudiés dans ce contexte.

Les récepteurs des oestrogènes et des androgènes sont ensuite clonés dans le but d'étudier les mécanismes d'action des hormones stéroïdiennes. La stratégie de clonage choisie a été la PCR dégénérée, suivie de RACE PCR.

Le cDNA d'ER α isolé contient une ORF présumptive pouvant coder une protéine de 582 acides aminés présentant une forte conservation avec les séquences d'ER α d'autres vertébrés (67 ~ 81%). Plusieurs essais de PCR dégénérée ont été effectués pour isoler un éventuel ER β , mais en vain. Malgré cet échec, l'existence d'un ER β chez le pleurodèle est probable puisqu'il a été mise en évidence chez *Triturus marmoratus* grâce à des anticorps dirigés contre les récepteurs humains (Arenas *et al.* 2001). Le northern blot pourrait déterminer l'existence de telles isoformes.

Pour minimiser les risques de croisement avec ER β , l'analyse de l'expression d'ER α a été réalisée par RT-PCR en utilisant des amorces choisies dans des zones différentielles entre ER α et ER β par comparaison avec les séquences connues chez les autres vertébrés, en particulier le xénope. Nos résultats, que ce soit dans les différents tissus adultes ou pendant la vie larvaire, montrent que ER α est impliqué dans la différenciation du sexe de pleurodèle.

L'analyse de l'expression par RT-PCR dans les tissus adultes montre une expression spécifique des tissus reproducteurs (testicule, ovaire, tissu adipeux associé aux gonades, oviducte). L'expression d'ER α dans l'ovaire et le tissu adipeux est en accord avec la fonction de reproduction. L'expression observée dans l'oviducte nous confirme que le développement et le fonctionnement des canaux de Müller est bien contrôlé par les oestrogènes. L'expression dans le foie s'explique par l'implication d'ER α dans l'activation de la synthèse de vitéllogénine qui est oestrogéno-dépendante, comme chez les autres vertébrés (Lutz & Kloas 1999; Wu *et al.* 2003; Lutz *et al.* 2005). Chez le mâle, ER α est exprimé dans le testicule et le tissu adipeux où il pourrait jouer un rôle dans la spermatogenèse comme ce qui est montré chez le triton *Triturus marmoratus* et les mammifères (Arenas *et al.* 2001; Carreau *et al.* 2002; Lambard & Carreau 2005; Lambard *et al.* 2005). Cependant nous n'avons observé aucune expression dans le cerveau et le poumon, alors que l'aromatase est exprimée dans ces organes (Kuntz *et al.* 2004a; Kuntz *et al.* 2004b) : ceci pourrait suggérer l'intervention d'ER β dans le poumon et le cerveau.

Pendant la différenciation sexuelle, les profils d'expression d'ER α ont été obtenus par l'utilisation de deux techniques : la PCR en temps réel et hybridation *in toto*. Ces deux techniques ont été dans un premier temps mises au point grâce à l'aromatase, qui constitue un bon marqueur de la différenciation ovarienne (Kuntz *et al.* 2003a). Par PCR en temps réel, les différences d'expression de l'aromatase entre les femelles et les mâles sont de l'ordre de 23 fois au stade 54 et 50 fois au stade 54^{30d}. Ceci est confirmé par l'hybridation *in toto* où l'ovaire est très coloré par rapport au testicule au même stade. Or les différences d'expression de l'aromatase obtenues lors d'analyses par PCR semi-quantitative sont de l'ordre de 1 à 2 fois (Kuntz *et al.* 2003a). Ceci confirme que la PCR en temps réel est une technique beaucoup plus sensible et fiable pour les analyses quantitatives. En revanche, nous sommes toujours confrontés au problème de la taille des gonades : les gonades ne peuvent être analysées séparément du mésonéphros qu'à partir du stade 54^{30d}.

Chez le poulet, l'absence d'expression d'ER α dans la gonade droite semble être une

cause importante du développement ovarien unilatéral chez les oiseaux (Nakabayashi *et al.* 1998). Chez le pleurodèle, nos travaux montrent qu'ER α est exprimé de façon très précoce dans les gonades indifférenciées des mâles et des femelles, ce qui est en accord avec le fait que les deux sexes ont la capacité de répondre aux oestrogènes. Nos analyses au cours de la différenciation gonadique montrent une différence tardive dans l'expression d'ER α entre mâles et femelles : l'expression est plus élevée chez les femelles au stade 54^{30d}, c'est-à-dire après la fin de la période thermosensible, à un moment où l'ovaire est en cours de différenciation. A titre de comparaison, pour l'aromatase, la différence d'expression entre mâles et femelles est détectée dès le stade 54 (Kuntz *et al.*, 2003, nos présents travaux) et la différence d'activité dès le stade 52 (Chardard *et al.*, 1995). Comme ER α est exprimé dans le mésonéphros et que nous ne pouvons analyser les gonades de façon isolée qu'à partir du stade 54^{30d}, une différence d'expression plus précoce entre les gonades ne peut cependant être complètement exclue. Ces résultats suggèrent qu'ER α accompagne la différenciation ovarienne et que l'augmentation d'expression chez les femelles serait une conséquence de la production d'oestrogènes. En effet, il a été montré dans d'autres modèles qu'ER α peut réguler sa propre expression en se liant sur des demi-ERE présents dans la région promotrice (Menuet *et al.* 2004). En effet, chez les larves ZW élevées à 32°C, il est observé une diminution de l'expression d'ER α qui serait à mettre en relation avec l'inhibition de la production des oestrogènes par l'aromatase.

Afin de déterminer si l'augmentation de l'expression d'ER α est due aux oestrogènes et accompagne toujours la différenciation ovarienne, nous avons étudié l'effet d'hormones stéroïdes entraînant des inversions sexuelles. Cependant, les effets des hormones stéroïdes sur l'expression génique au cours de la différenciation sexuelle semblent très variables et difficiles à interpréter. Au niveau de l'expression de l'aromatase, une légère augmentation (non significative) est constatée chez les larves ZZ traitées à l'oestradiol. De même, la testostérone, qui provoque l'inversion des larves ZZ en femelles, n'a aucun effet sur l'expression de l'aromatase au niveau de la transcription. En revanche la DHT entraîne chez

les larves ZW une inhibition de la transcription de l'aromatase en relation avec l'inversion sexuelle en mâle.

Concernant l'expression gonadique d'ER α , les trois traitements par les stéroïdes n'entraînent aucun effet. L'expression reste faible chez les larves ZZ lors de l'inversion sexuelle en femelle par l'oestradiol ou par la testostérone tandis qu'elle reste élevée chez les larves ZW traitées par la DHT. En revanche, une forte augmentation de l'expression est observée dans le mésonéphros au stade 54^{30d} lors des traitements à la DHT et à la testostérone. La raison de cet effet nous est inconnue. Chez la salamandre *Ambystoma tigrinum*, la DHT a un effet oestrogénique et stimule la prolifération cellulaire et l'hypertrophie des canaux de Müller et de Wolff (Clark *et al.* 1998). Or, les canaux de Wolff sont associés au mésonéphros. Ceci pourrait expliquer en partie l'augmentation d'ER α dans le mésonéphros chez le pleurodèle sous l'effet de la DHT et de la testostérone. Quoi qu'il en soit, ces traitements sont difficiles à interpréter au niveau de l'expression d'ER α car des rétrocontrôles aussi bien positifs que négatifs sont envisageables.

La séquence promotrice d'ER α isolée à partir de l'ADN génomique du foie d'un animal femelle ZW a une taille de 1528pb. La région 5'UTR mesure 215pb, ce qui est similaire aux autres espèces (Kos *et al.* 2001). Par comparaison avec les consensus des motifs *cis*, nous avons pu identifier plusieurs sites potentiels de fixation de différents facteurs : SRY ; demi-ERE₁ (estrogen receptor element) ; Δ EF1 ; AP1₁ ; demi-ERE₂ ; Wt1 ; Oct1-FHRE (forkhead response element) ; GR (glucocorticoid receptor) ; AP1₂ et Sox5 (SRY related protein 5). Chez l'homme et le xénope, la combinaison des sites demi-ERE et AP1 et leur utilisation dans l'activation de gènes cibles ont été beaucoup étudiés sous des conditions hormone- et/ou récepteur- dépendantes (Chang *et al.* 1992; Paech *et al.* 1997). Le facteur de transcription Foxl2 de la famille de facteurs Forkhead est un facteur important de la différenciation ovarienne chez plusieurs espèces (Govoroun *et al.* 2004; Baron *et al.* 2004; Madureira *et al.* 2006; Nakamoto *et al.* 2006). Chez le tilapia et la chèvre, Foxl2 régule

l'expression de l'aromatase en se liant sur son élément de réponse dans la région promotrice (Pannetier *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007). Ceci suggère une possible relation entre les facteurs Fox et l'expression d'ER α lors de la différenciation ovarienne chez le pleurodèle.

Des analyses par transfection dans les cellules cancéreuses de prostate révèlent une implication inhibitrice du facteur CTCFL/BORIS dans l'expression de l'ER α de pleurodèle. Ce facteur est exprimé spécifiquement dans les cellules germinales mâles embryonnaires. Il intervient dans la programmation épigénétique en s'associant avec les sites méthylés de la chromatine (Nguyen *et al.* 2008; Sun *et al.* 2008). L'étude de ce facteur chez le pleurodèle, comme la recherche des régions réellement méthylées et/ou l'immunoprécipitation sur la chromatine en analysant la fixation de ce facteur, pourrait être envisagée.

Les anticorps commerciaux dirigés contre ER α ou AR humains ne nous ont pas permis d'obtenir de signaux chez le pleurodèle. Ce type d'anticorps avait pourtant permis d'étudier ces récepteurs chez *Triturus marmoratus* (Arenas *et al.* 2001). Nous avons donc cherché à développer des anticorps. Pour cela, des peptides recombinants ont été produits et ont servi à immuniser des lapins. Ces anticorps se sont pour le moment révélés peu fiables en donnant en western blot des résultats variables. Ces anticorps devaient nous servir à identifier les cellules cibles des oestrogènes dans la gonade (cellules germinales ? cellules folliculaires ? cellules du stroma ?) mais les premiers résultats obtenus en immuno-histologie ne sont pas non plus concluants. Au cours de nos études, nous avons utilisé différents fixateurs mais nous avons toujours utilisés la paraffine comme milieu d'inclusion. Il est possible qu'il faille avoir recours à des coupes à congélation réalisées à partir d'un milieu d'inclusion adapté. Les antigènes pourraient être mieux conservés lors de ces procédures. Il est certain qu'une meilleure compréhension du rôle des oestrogènes passe par une identification des types cellulaires exprimant les récepteurs de ces hormones.

Le rôle des androgènes dans la différenciation des gonades est beaucoup plus

controversé que celui des oestrogènes. La production d'androgènes est plus délicate à déterminer car ceux-ci sont de nature beaucoup plus variée que les oestrogènes. Chez les vertébrés ovipares, mis à part les téléostéens, les voies métaboliques de la stéroïdogénèse sont peu connues. Chez les téléostéens, les androgènes 11-oxygénés semblent être des facteurs clés de la différenciation testiculaire : chez la truite, l'expression de la 11 β -hydroxylase est 100 fois plus importante dans les futurs testicules que dans les futurs ovaires (Liu *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont été obtenus chez le bar *Dicentrarchus labrax* (Socorro *et al.*, 2007). Les potentialités stéroïdogènes des testicules en différenciation ont été très peu étudiées chez les amphibiens et les reptiles, si bien que, mis à part chez les téléostéens, il n'a été mis en évidence chez aucune espèce de vertébré ovipare, une production d'androgènes directement en rapport avec la différenciation gonadique. Chez le pleurodèle, il est possible d'inverser le sexe des larves ZW par des traitements avec des androgènes non aromatisables comme la DHT ou la 11 β -hydroxyandrostenedione (Chardard *et al.*, 2003) mais le rôle précis de ces androgènes reste inconnu. Aussi, en parallèle des travaux sur ER α , nous avons mené les mêmes expériences sur le récepteur des androgènes.

Le clone d'AR isolé comprend une ORF partielle, susceptible de coder un peptide de 304 résidus d'acides aminés qui présente le domaine de liaison au ligand et une partie du domaine de liaison à l'ADN : ces deux domaines sont très conservés avec d'autres espèces de vertébrés (78 à 93% d'identité). Pour cloner l'extrémité 5' du cDNA, plusieurs tentatives de RACE PCR ont été réalisées en vain.

L'analyse par RT-PCR dans les tissus adultes montre une expression d'AR ubiquitaire. En revanche l'analyse en western blot révèle une présence de la protéine dans le cerveau et la rate ainsi que dans le testicule chez les mâles et l'oviducte chez les femelles. Ces différences entre les profils d'expression des ARN messagers et des protéines pourraient s'expliquer par la stabilité d'AR due aux modifications post-traductionnelles (Yeap *et al.* 2004; Reddy *et al.* 2006). La présence de l'AR dans le cerveau pourrait avoir un rôle dans les cycles

reproducteurs comme chez la grenouille *Rana esculenta* (Paolucci 2003) ou dans la masculinisation cérébrale pour la régulation des comportements sexuels comme chez l'oiseau *Taeniopygia guttata* (Perlman *et al.* 2003; Kim *et al.* 2004). Chez le pleurodèle, l'expression protéique de l'AR dans l'oviducte varie suivant la saison, mais le mécanisme de ce changement reste inconnu. La protéine AR est aussi détectée dans l'oviducte chez d'autres espèces, comme chez la tortue *Trachemys scripta* (Selcer *et al.* 2005), le poulet (Okada *et al.* 2003) et le Rat (Ellis & Danzo 1989).

Au cours de la différenciation gonadique, les études réalisées par PCR en temps réel et hybridation *in toto* montrent comme pour ER α , une expression précoce dans les deux sexes puis une différence d'expression entre mâles et femelles à des stades plus tardifs. L'expression est plus élevée chez les femelles dès le stade 54^{15d} et cette différence persiste dans les gonades au stade 54^{30d}. Cette différence d'expression se retrouve à un faible niveau en hybridation *in toto*. Néanmoins, les premiers western blots réalisés ne montrent pas de différence au niveau protéique au stade 54^{30d}. Il faut toujours signaler que ces analyses en western blot ont été réalisées sur les complexes gonade-mésonephros-organe interrénal et non sur les gonades seules comme pour la PCR en temps réel.

Comme pour ER α , les effets des hormones stéroïdes sur l'expression d'AR sont difficiles à interpréter. L'expression de l'AR n'augmente pas chez les animaux ZZ^{E2} et ZZ^{Testo} ; en revanche, l'expression est diminuée dans les gonades au stade 54^{30d} chez les individus femelles traités à la DHT.

En conclusion, l'expression du récepteur des androgènes ne semble pas indiquer de rôle dans la différenciation testiculaire, mais une augmentation de l'expression est observée en relation avec la différenciation ovarienne. D'autres approches sont nécessaires pour démontrer ou éliminer un rôle éventuel des stéroïdes androgènes dans la différenciation testiculaire comme l'étude des enzymes de production d'androgènes non aromatisables comme la 5 α -réductase ou la 11 β -hydroxylase. L'utilisation d'anticorps permettant de mettre en évidence les stéroïdes (anti-testostérone) pourrait aussi être envisagée. En effet, les parabioses

chez le pleurodèle montrent bien que des hormones mâles empêchent le développement ovarien : stéroïdes non aromatisables ou AMH, la question reste posée.

VIII. Références bibliographiques

VIII. Références bibliographiques

- Afonso LO, Iwama GK, Smith J & Donaldson EM 1999 Effects of the aromatase inhibitor Fadrozole on plasma sex steroid secretion and ovulation rate in female coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, close to final maturation. *Gen.Comp Endocrinol.* **113** 221-229.
- Akatsuka N, Komatsuzaki E, Ishikawa A, Suzuki I, Yamane N & Miyata S 2005 Expression of the gonadal p450 aromatase gene of *Xenopus* and characterization of the 5'-flanking region of the aromatase gene. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **96** 45-50.
- Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR & Hardy MP 2004 Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* **145** 592-603.
- Alsop DH, Brown SB & van der Kraak GJ 2004 Dietary retinoic acid induces hindlimb and eye deformities in *Xenopus laevis*. *Environ.Sci.Technol.* **38** 6290-6299.
- Alworth LC, Howdeshell KL, Ruhlen RL, Day JK, Lubahn DB, Huang TH, Besch-Williford CL & vom Saal FS 2002 Uterine responsiveness to estradiol and DNA methylation are altered by fetal exposure to diethylstilbestrol and methoxychlor in CD-1 mice: effects of low versus high doses. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **183** 10-22.
- Aoyama S, Shibata K, Tokunaga S, Takase M, Matsui K & Nakamura M 2003 Expression of Dmrt1 protein in developing and in sex-reversed gonads of amphibians. *Cytogenet.Genome Res.* **101** 295-301.
- Arai S, Ogawa K, Yamachika S, Nishihara T & Nishikawa J 2001 Cloning and functional characterization of chicken p160 coactivator family members. *Biochim.Biophys.Acta* **1518** 7-18.
- Arenas MI, Royuela M, Lobo MV, Alfaro JM, Fraile B & Paniagua R 2001 Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and estrogen receptor-beta (ER-beta) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus marmoratus* during the annual cycle. *J.Anat.* **199** 465-472.
- Ascenzi P, Bocedi A & Marino M 2006 Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol.Aspects Med.* **27** 299-402.
- Asman DC, Takimoto K, Pitot HC, Dunn TJ & Lindahl R 1993 Organization and characterization of the rat class 3 aldehyde dehydrogenase gene. *J.Biol.Chem.* **268** 12530-12536.
- Aube M, Larochelle C & Ayotte P 2008 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE) disrupts the estrogen-androgen balance regulating the growth of hormone-dependent breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **10** R16.
- Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F & Jouannet P 1995 Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N.Engl.J.Med.* **332** 281-285.
- Austin HB 1989 The effects of estradiol and testosterone on mullerian-duct regression in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Gen.Comp Endocrinol.* **76** 461-472.
- Axelsson J, Mattsson A, Brunstrom B & Halldin K 2007 Expression of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the brain of Japanese quail embryos. *Dev.Neurobiol.* **67** 1742-1750.
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M & . 1994 A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat.Genet.* **7** 497-501.
- Baroiller JF & D'Cotta H 2001 Environment and sex determination in farmed fish. *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* **130** 399-409.
- Baron D, Cocquet J, Xia X, Fellous M, Guiguen Y & Veitia RA 2004 An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *J.Mol.Endocrinol.* **33** 705-715.
- Beetschen JC 1967 [5 generations of polyploid individuals in the salamander, *Pleurodeles watlil* Michah].

C.R.Seances Soc.Biol.Fil. **161** 930-936.

Bell R, Murday VA, Patton MA & Jeffery S 2001 Two families with blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome have mutations in the putative forkhead transcription factor FOXL2. *Genet.Test.* **5** 335-338.

Bergeron JM, Gahr M, Horan K, Wibbels T & Crews D 1998 Cloning and in situ hybridization analysis of estrogen receptor in the developing gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Dev.Growth Differ.* **40** 243-254.

Bergeron JM, Willingham E, Osborn CT, III, Rhen T & Crews D 1999 Developmental synergism of steroidal estrogens in sex determination. *Environ.Health Perspect.* **107** 93-97.

Bernard DJ, Bentley GE, Balthazart J, Turek FW & Ball GF 1999 Androgen receptor, estrogen receptor alpha, and estrogen receptor beta show distinct patterns of expression in forebrain song control nuclei of European starlings. *Endocrinology* **140** 4633-4643.

Bhandari RK, Komuro H, Higa M & Nakamura M 2004 Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zoolog.Sci.* **21** 305-310.

Blazquez M & Piferrer F 2005 Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) androgen receptor: cDNA cloning, tissue-specific expression, and mRNA levels during early development and sex differentiation. *Mol.Cell Endocrinol.* **237** 37-48.

Bogi C, Levy G, Lutz I & Kloas W 2002 Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **133** 559-570.

Bogi C, Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Steineck C, Sinowatz F, Kalbfus W, Negele RD, Lutz I & Kloas W 2003 Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. *Environ.Res.* **93** 195-201.

Bowles J & Koopman P 2007 Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* **134** 3401-3411.

Brand H, Kos M, Denger S, Flouriot G, Gromoll J, Gannon F & Reid G 2002 A novel promoter is involved in the expression of estrogen receptor alpha in human testis and epididymis. *Endocrinology* **143** 3397-3404.

Brennan J & Capel B 2004 One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat.Rev.Genet.* **5** 509-521.

Bruggeman V, Van AP & Decuypere E 2002 Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* **131** 839-846.

Burakov D, Crofts LA, Chang CP & Freedman LP 2002 Reciprocal recruitment of DRIP/mediator and p160 coactivator complexes in vivo by estrogen receptor. *J.Biol.Chem.* **277** 14359-14362.

Cadigan KM & Nusse R 1997 Wnt meeting 1996. *Biochim.Biophys.Acta* **1332** R1-R5.

Canning CA & Lovell-Badge R 2002 Sry and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet.* **18** 111-113.

Cardazzo B, Zappulli V, Frassinetti F, Patarnello T, Castagnaro M & Bargelloni L 2005 Full-length sequence and expression analysis of estrogen receptor alpha mRNA in feline mammary tumors. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **96** 109-118.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N & Skakkebaek NE 1992 Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305** 609-613.

Carreau S, Bourguiba S, Lambard S & Galeraud-Denis I 2002 [Testicular aromatase]. *J.Soc.Biol.* **196** 241-244.

Carreau S, Delalande C, Silandre D, Bourguiba S & Lambard S 2006 Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Mol.Cell Endocrinol.* **246** 65-68.

Cevasco A, Urbatzka R, Bottero S, Massari A, Pedemonte F, Kloas W & Mandich A 2008 Endocrine disrupting chemicals (EDC) with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: II. Effects on gonad histomorphology. *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* **147** 241-251.

Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M & Meaney MJ 2006 Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial

- preoptic area of female offspring. *Endocrinology* **147** 2909-2915.
- Chang TC, Nardulli AM, Lew D & Shapiro DJ 1992 The role of estrogen response elements in expression of the *Xenopus laevis* vitellogenin B1 gene. *Mol.Endocrinol.* **6** 346-354.
- Chang X, Kobayashi T, Senthilkumaran B, Kobayashi-Kajura H, Sudhakumari CC & Nagahama Y 2005 Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen.Comp Endocrinol.* **141** 101-115.
- Chardard D, Desvages G, Pieau C & Dournon C 1995 Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen.Comp Endocrinol.* **99** 100-107.
- Chardard D & Dournon C 1999 Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. *J.Exp.Zool.* **283** 43-50.
- Chardard D, Kuntz S, Chesnel A & Flament S 2003 Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. *J.Exp.Zool.A Comp Exp.Biol.* **296** 46-55.
- Cheskis BJ, McKenna NJ, Wong CW, Wong J, Komm B, Lyttle CR & O'Malley BW 2003 Hierarchical affinities and a bipartite interaction model for estrogen receptor isoforms and full-length steroid receptor coactivator (SRC/p160) family members. *J.Biol.Chem.* **278** 13271-13277.
- Chiang EF, Pai CI, Wyatt M, Yan YL, Postlethwait J & Chung B 2001 Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev.Biol.* **231** 149-163.
- Chou YJ & Dietrich DR 1999 Interactions of nitromusk parent compounds and their amino-metabolites with the estrogen receptors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Toxicol.Lett.* **111** 27-36.
- Claessens F, Denayer S, Van TN, Kerkhofs S, Helsen C & Haelens A 2008 Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl.Recept.Signal.* **6** e008.
- Clark EJ, Norris DO & Jones RE 1998 Interactions of gonadal steroids and pesticides (DDT, DDE) on gonaduct growth in larval tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Gen.Comp Endocrinol.* **109** 94-105.
- Colborn T & Smolen MJ 1996 Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans. *Rev.Environ.Contam Toxicol.* **146** 91-172.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ & Korach KS 1999 Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* **286** 2328-2331.
- Crews D & Bergeron JM 1994 Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *J.Endocrinol.* **143** 279-289.
- Crews D, Bull JJ & Wibbels T 1991 Estrogen and sex reversal in turtles: a dose-dependent phenomenon. *Gen.Comp Endocrinol.* **81** 357-364.
- Crews D, Fleming A, Willingham E, Baldwin R & Skipper JK 2001 Role of steroidogenic factor 1 and aromatase in temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle. *J.Exp.Zool.* **290** 597-606.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A & Pilia G 2001 The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat.Genet.* **27** 159-166.
- Danzo BJ 1997 Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ.Health Perspect.* **105** 294-301.
- De GK, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM & Verhoeven G 2004 A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101** 1327-1332.
- Delbes G, Levacher C, Pairault C, Racine C, Duquenne C, Krust A & Habert R 2004 Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal

life. *Endocrinology* **145** 3395-3403.

Desvages G & Pieau C 1992 Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **41** 851-853.

Dodd KL & Wibbels T 2008 Estrogen inhibits caudal progression but stimulates proliferation of developing mullerian ducts in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* **150** 315-319.

Dong L, Ma Q & Whitlock JP, Jr. 1996 DNA binding by the heterodimeric Ah receptor. Relationship to dioxin-induced CYP1A1 transcription in vivo. *J.Biol.Chem.* **271** 7942-7948.

Dournon & Houillon. Thermosensibilite de la differenciation sexuelle chez l'Amphibien Urodele *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phenotype sexuel de toutes les femelles genetiques sous l'action de la temperature d'elevage. *Reprod.Nutr.Dev.* **25**, 671-688. 1985. Ref Type: Generic

Drews U, Sulak O & Oppitz M 2001 Immunohistochemical localisation of androgen receptor during sex-specific morphogenesis in the fetal mouse. *Histochem.Cell Biol.* **116** 427-439.

Dumond H, Maufruid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A & Flament S 2008 Freemartin in the amphibian *Pleurodeles waltli*: parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. *Mol.Reprod.Dev.* **75** 439-449.

Dupont S, Dennefeld C, Krust A, Chambon P & Mark M 2003 Expression of Sox9 in granulosa cells lacking the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta. *Dev.Dyn.* **226** 103-106.

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

Elliott JE, Norstrom RJ & Keith JA 1988 Organochlorines and eggshell thinning in northern gannets (*Sula bassanus*) from Eastern Canada, 1968-1984. *Environ.Pollut.* **52** 81-102.

Ellis DL & Danzo BJ 1989 Identification of an androgen receptor in the adult chicken oviduct. *J.Steroid Biochem.* **33** 1081-1086.

Emmerson J, Korsgaard B & Petersen I 1979 Dose response kinetics of serum vitellogenin, liver DNA, RNA, protein and lipid after induction by estradiol-17 beta in male flounders (*Platichthys flesus* L.). *Comp Biochem.Physiol B* **63** 1-6.

Enmark E, Peltto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjoeld M & Gustafsson JA 1997 Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82** 4258-4265.

Evans MI & McKnight GS 1984 Regulation of the ovalbumin gene: effects of insulin, adenosine 3',5'-monophosphate, and estrogen. *Endocrinology* **115** 368-377.

Evans NP, North T, Dye S & Sweeney T 2004 Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest.Anim Endocrinol.* **26** 61-73.

Favreau LV & Pickett CB 1991 Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J.Biol.Chem.* **266** 4556-4561.

Ferrier V., Jaylet A. Cayrol C. Gasser F. Buisan J. J. Etude electrophoretiques des peptidases erythrocytaires chez *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodele) : mise en evidence d'une liaison avec le sexe. *Acad.Sc.Paris ser. D290*, 571-574. 1980.

Ref Type: Generic

Filby AL & Tyler CR 2005 Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Biol.Reprod.* **73** 648-662.

Fitzpatrick SL & Richards JS 1991 Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* **129** 1452-1462.

Flament S, Kuntz S, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Tankozic C, Penrad-Mobayed M, Auque G, Shirali P, Schroeder H & Chardard D 2003 Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles waltli*

(urodele amphibian). *Aquat.Toxicol.* **64** 143-153.

Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V & Gannon F 2000 Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* **19** 4688-4700.

Flouriot G, Griffin C, Kenealy M, Sonntag-Buck V & Gannon F 1998 Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol.Endocrinol.* **12** 1939-1954.

Foidart A, Lakaye B, Grisar T, Ball GF & Balthazart J 1999 Estrogen receptor-beta in quail: cloning, tissue expression and neuroanatomical distribution. *J.Neurobiol.* **40** 327-342.

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN & . 1994 Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372** 525-530.

Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ & McDonnell DP 1997 Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **143** 205-212.

Gale WL, Patino R & Maule AG 2004 Interaction of xenobiotics with estrogen receptors alpha and beta and a putative plasma sex hormone-binding globulin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen.Comp Endocrinol.* **136** 338-345.

Gallien L. and Durocher M. Table chronologique du developpement chez *Pleurodeles waltl*. Bull.Biol.Fr.Belg. 91, 97-114. 1957.

Ref Type: Generic

Gallien L 1952 Elevage et comportement du Pleurodèle en laboratoire. *Bull. Soc. Zool., Fr.*, **77**, 456-461

Gallien L 1954 [Demonstration of homogametic characteristics of the male sex in triton *Pleurodeles waltlii* Michah. by the study of descendance of animals of the sex physiologically inverse following estradiol benzoate therapy.]. *C.R.Hebd.Seances Acad.Sci.* **238** 402-404.

Gallien L 1951 [Unisexual progeny of a female *Pleurodeles Waltlii* Michah, subjected, during the larval stage, to the gynogenic effect of estradiol benzoate.]. *C.R.Hebd.Seances Acad.Sci.* **233** 828-830.

Gao W, Bohl CE & Dalton JT 2005 Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem.Rev.* **105** 3352-3370.

Gardner L, Anderson T, Place AR, Dixon B & Elizur A 2005 Sex change strategy and the aromatase genes. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **94** 395-404.

Gillesby BE, Stanostefano M, Porter W, Safe S, Wu ZF & Zacharewski TR 1997 Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry* **36** 6080-6089.

Gilliland CD, Summer CL, Gilliland MG, Kannan K, Villeneuve DL, Coady KK, Muzzall P, Mehne C & Giesy JP 2001 Organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls, and metals in water, sediment, and green frogs from southwestern Michigan. *Chemosphere* **44** 327-339.

Gioeli D, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD, White FM, Christian RE, Settlege RE, Shabanowitz J, Hunt DF & Weber MJ 2002 Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J.Biol.Chem.* **277** 29304-29314.

Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I, Batellier F & Cotinot C 2004 Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev.Dyn.* **231** 859-870.

Griffin C, Flouriot G, Sonntag-Buck V, Nestor P & Gannon F 1998 Identification of novel chicken estrogen receptor-alpha messenger ribonucleic acid isoforms generated by alternative splicing and promoter usage. *Endocrinology* **139** 4614-4625.

Grilli M. 1937 Sull' origine dei corpi grassi negli Amphibi (Ricerche in *Salamandrina perpicillata* e *Bufo viridis*). *Arch. ital. Anat. e Embriol.* **34**, 562-602.

- Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, Mcmeel OM, Martin SA & Fostier A 1999 Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol.Reprod.Dev.* **54** 154-162.
- Guillette LJ, Jr., Crain DA, Rooney AA & Pickford DB 1995 Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ.Health Perspect.* **103 Suppl 7** 157-164.
- Gyllenhammar I, Holm L, Eklund R & Berg C 2008 Reproductive toxicity in *Xenopus tropicalis* after developmental exposure to environmental concentrations of ethynylestradiol. *Aquat.Toxicol.*
- Hall JM & McDonnell DP 1999 The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* **140** 5566-5578.
- Halm S, Martinez-Rodriguez G, Rodriguez L, Prat F, Mylonas CC, Carrillo M & Zanuy S 2004 Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mol.Cell Endocrinol.* **223** 63-75.
- Hankinson O 1995 The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **35** 307-340.
- Hart CA, Nisbet IC, Kennedy SW & Hahn ME 2003 Gonadal feminization and halogenated environmental contaminants in common terns (*Sterna hirundo*): evidence that ovotestes in male embryos do not persist to the prefledgling stage. *Ecotoxicology.* **12** 125-140.
- Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A & Thomas P 2000 Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** 10751-10756.
- Hayes TB 1998 Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J.Exp.Zool.* **281** 373-399.
- Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, Johnston G, Liu R & Kpodzo D 2006 Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17beta-estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environ.Health Perspect.* **114 Suppl 1** 134-141.
- He B, Rhodes-Brower S, Miller MR, Munson AE, Germolec DR, Walker VR, Korach KS & Meade BJ 2003a Octamethylcyclotetrasiloxane exhibits estrogenic activity in mice via ERalpha. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **192** 254-261.
- He CL, Du JL, Lee YH, Huang YS, Nagahama Y & Chang CF 2003b Differential messenger RNA transcription of androgen receptor and estrogen receptor in gonad in relation to the sex change in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Biol.Reprod.* **69** 455-461.
- Hecker M, Kim WJ, Park JW, Murphy MB, Villeneuve D, Coady KK, Jones PD, Solomon KR, Van Der KG, Carr JA, Smith EE, du PL, Kendall RJ & Giesy JP 2005 Plasma concentrations of estradiol and testosterone, gonadal aromatase activity and ultrastructure of the testis in *Xenopus laevis* exposed to estradiol or atrazine. *Aquat.Toxicol.* **72** 383-396.
- Herbst AL, Ulfelder H & Poskanzer DC 1971 Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N.Engl.J.Med.* **284** 878-881.
- Herynk MH & Fuqua SA 2004 Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr.Rev.* **25** 869-898.
- Hinshelwood MM, Dodson MM, Sun T & Simpson ER 1997 Regulation of aromatase expression in the ovary and placenta: a comparison between two species. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **61** 399-405.
- Ho SM, Tang WY, Belmonte de FJ & Prins GS 2006 Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* **66** 5624-5632.
- Holdcraft RW & Braun RE 2004 Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* **131** 459-467.

- Holmes MM & Wade J 2005 Testosterone regulates androgen receptor immunoreactivity in the copulatory, but not courtship, neuromuscular system in adult male green anoles. *J.Neuroendocrinol.* **17** 560-569.
- Hotchkiss AK, Ostby JS, Vandenberg JG & Gray LE, Jr. 2003 An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiol Behav.* **79** 151-156.
- Huang YW, Matthews JB, Fertuck KC & Zacharewski TR 2005 Use of *Xenopus laevis* as a model for investigating in vitro and in vivo endocrine disruption in amphibians. *Environ.Toxicol.Chem.* **24** 2002-2009.
- Huang ZQ, Li J & Wong J 2002 AR possesses an intrinsic hormone-independent transcriptional activity. *Mol.Endocrinol.* **16** 924-937.
- Hung CM & Li C 2004 Identification and phylogenetic analyses of the protein arginine methyltransferase gene family in fish and ascidians. *Gene* **340** 179-187.
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M & Nagahama Y 2008 Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol.Reprod.* **78** 333-341.
- Ikeda Y, Shen 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.
- Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T & Nagahama Y 2001 Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **129** 449-455.
- Ikonen T, Palvimo JJ, Kallio PJ, Reinikainen P & Janne OA 1994 Stimulation of androgen-regulated transactivation by modulators of protein phosphorylation. *Endocrinology* **135** 1359-1366.
- Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW & Visser JA 2000 Autocrine and paracrine Mullerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog.Horm.Res.* **55** 53-67.
- Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E & Aitken J 1996 Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* **312** 467-471.
- Jelinic P, Stehle JC & Shaw P 2006 The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS.Biol.* **4** e355.
- Jenster G, van der Korput HA, Trapman J & Brinkmann AO 1995 Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J.Biol.Chem.* **270** 7341-7346.
- Joly J 1966 Sur l'éthologie sexuelle de *Salamandra salamandra* L. *Zeitschrift Tierpsychol.*, **23**, 8-27.
- Kang IH, Kim HS, Shin JH, Kim TS, Moon HJ, Kim IY, Choi KS, Kil KS, Park YI, Dong MS & Han SY 2004 Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p, p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology* **199** 145-159.
- Kase R, Hansen PD, Fischer B, Manz W, Heininger P & Reifferscheid G 2008 Integral assessment of estrogenic potentials of sediment-associated samples. Part 1: The influence of salinity on the in vitro tests ELRA, E-Screen and YES. *Environ.Sci.Pollut.Res.Int.* **15** 75-83.
- Kato S, Matsumoto T, Kawano H, Sato T & Takeyama K 2004a Function of androgen receptor in gene regulations. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **89-90** 627-633.
- Kato T, Matsui K, Takase M, Kobayashi M & Nakamura M 2004b Expression of P450 aromatase protein in developing and in sex-reversed gonads of the XX/XY type of the frog *Rana rugosa*. *Gen.Comp Endocrinol.* **137** 227-236.
- Katsu Y, Bermudez DS, Braun EL, Helbing C, Miyagawa S, Gunderson MP, Kohno S, Bryan TA, Guillette LJ, Jr. & Iguchi T 2004 Molecular cloning of the estrogen and progesterone receptors of the American alligator. *Gen.Comp Endocrinol.* **136** 122-133.
- Katsu Y, Hinago M, Sone K, Urushitani H, Guillette LJ, Jr. & Iguchi T 2007 In vitro assessment of transcriptional activation of the estrogen and androgen receptors of mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*. *Mol.Cell Endocrinol.* **276** 10-17.
- Katsu Y, Kohno S, Oka T, Mitsui N, Tooi O, Santo N, Urushitani H, Fukumoto Y, Kuwabara K, Ashikaga K, Minami S, Kato S, Ohta Y, Guillette LJ, Jr. & Iguchi T 2006 Molecular cloning of estrogen receptor alpha

- (ERalpha; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol.Cell Endocrinol.* **257-258** 84-94.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T & Tilson HA 1996 Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ.Health Perspect.* **104 Suppl 4** 715-740.
- Kazeto Y, Place AR & Trant JM 2004 Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat.Toxicol.* **69** 25-34.
- Kelce WR, Lambright CR, Gray LE, Jr. & Roberts KP 1997 Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **142** 192-200.
- Kelce WR & Wilson EM 1997 Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J.Mol.Med.* **75** 198-207.
- Keller JM & Clellan-Green P 2004 Effects of organochlorine compounds on cytochrome P450 aromatase activity in an immortal sea turtle cell line. *Mar.Environ.Res.* **58** 347-351.
- Kenealy MR, Flouriot G, Sonntag-Buck V, Dandekar T, Brand H & Gannon F 2000 The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. *Endocrinology* **141** 2805-2813.
- 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.
- Kesler CT, Gioeli D, Conaway MR, Weber MJ & Paschal BM 2007 Subcellular localization modulates activation function 1 domain phosphorylation in the androgen receptor. *Mol.Endocrinol.* **21** 2071-2084.
- Kim IH, Son HY, Cho SW, Ha CS & Kang BH 2003 Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol.Lett.* **138** 185-192.
- Kim YH, Perlman WR & Arnold AP 2004 Expression of androgen receptor mRNA in zebra finch song system: developmental regulation by estrogen. *J.Comp Neurol.* **469** 535-547.
- Kiparissis Y, Metcalfe TL, Balch GC & Metcalfe CD 2003 Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat.Toxicol.* **63** 391-403.
- Kleinow KM, Melancon MJ & Lech JJ 1987 Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environ.Health Perspect.* **71** 105-119.
- Kloas W, Lutz I & Einspanier R 1999 Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci.Total Environ.* **225** 59-68.
- Kliver N, Kondo M, Herpin A, Mitani H & Scharl M 2005 Divergent expression patterns of Sox9 duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. *Dev.Genes Evol.* **215** 297-305.
- Koopman P, Schepers G, Brenner S & Venkatesh B 2004 Origin and diversity of the SOX transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes*. *Gene* **328** 177-186.
- Kos M, Reid G, Denger S & Gannon F 2001 Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol.Endocrinol.* **15** 2057-2063.
- Kozie KD & Anderson RK 1991 Productivity, diet, and environmental contaminants in bald eagles nesting near the Wisconsin shoreline of Lake Superior. *Arch.Environ.Contam Toxicol.* **20** 41-48.
- Kubota K, Ohsako S, Kurosawa S, Takeda K, Qing W, Sakaue M, Kawakami T, Ishimura R & Tohyama C 2003 Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J.Reprod.Dev.* **49** 403-412.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138** 863-870.
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Ducatez M, Callier M & Flament S 2004a Expression of aromatase and

- steroidogenic factor 1 in the lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology* **145** 3111-3114.
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I & Flament S 2003a Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenet.Genome Res.* **101** 283-288.
- Kuntz S, Chardard D, Ko CI, Dumond H, Ducatez M, Callier M, Flament S & Chesnel A 2006 Female-enriched and thermosensitive expression of steroidogenic factor-1 during gonadal differentiation in *Pleurodeles waltl*. *J.Mol.Endocrinol.* **36** 175-186.
- Kuntz S, Chesnel A, Duterque-Coquillaud M, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Dournon C, Flament S & Chardard D 2003b Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **84** 89-100.
- Kuntz S, Chesnel A, Flament S & Chardard D 2004b Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltl*. *J.Mol.Endocrinol.* **33** 717-727.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM & Webb P 2000 Estrogen receptor pathways to AP-1. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **74** 311-317.
- Lacey M, Bohday J, Fonseka SM, Ullah AI & Whitehead SA 2005 Dose-response effects of phytoestrogens on the activity and expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase in human granulosa-luteal cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **96** 279-286.
- Lambard S & Carreau S 2005 Aromatase and oestrogens in human male germ cells. *Int.J.Androl* **28** 254-259.
- Lambard S, Silandre D, Delalande C, is-Galeraud I, Bourguiba S & Carreau S 2005 Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **95** 63-69.
- Lambertini E, Tavanti E, Torreggiani E, Penolazzi L, Gambari R & Piva R 2008 ERalpha and AP-1 interact in vivo with a specific sequence of the F promoter of the human ERalpha gene in osteoblasts. *J.Cell Physiol* **216** 101-110.
- Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW 1999 A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* **97** 17-27.
- Lasala C, Carre-Eusebe D, Picard JY & Rey R 2004 Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-Mullerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species. *DNA Cell Biol.* **23** 572-585.
- Laven JS & Fauser BC 2006 What role of estrogens in ovarian stimulation. *Maturitas* **54** 356-362.
- Le DY, Lazennec G, Kern L, Saligaut D, Pakdel F & Valotaire Y 1995 Characterization of an estrogen-responsive element implicated in regulation of the rainbow trout estrogen receptor gene. *J.Mol.Endocrinol.* **15** 37-47.
- Lee JH, Kim J & Shapiro DJ 1995 Regulation of *Xenopus laevis* estrogen receptor gene expression is mediated by an estrogen response element in the protein coding region. *DNA Cell Biol.* **14** 419-430.
- Levy G, Lutz I, Kruger A & Kloas W 2004 Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ.Res.* **94** 102-111.
- Loffler KA, Zarkower D & Koopman P 2003 Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* **144** 3237-3243.
- Loomis AK & Thomas P 1999 Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis: different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER. *Biol.Reprod.* **61** 51-60.
- Lutz I, Blodt S & Kloas W 2005 Regulation of estrogen receptors in primary cultured hepatocytes of the amphibian *Xenopus laevis* as estrogenic biomarker and its application in environmental monitoring. *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* **141** 384-392.
- Lutz I & Kloas W 1999 Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci.Total Environ.* **225** 49-57.
- Lutz LB, Jamnongjit M, Yang WH, Jahani D, Gill A & Hammes SR 2003 Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands. *Mol.Endocrinol.* **17** 1106-1116.

- Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL & White BA 1993 Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol.Endocrinol.* **7** 776-786.
- MacLean HE, Warne GL & Zajac JD 1997 Localization of functional domains in the androgen receptor. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **62** 233-242.
- Madureira PA, Varshochi R, Constantinidou D, Francis RE, Coombes RC, Yao KM & Lam EW 2006 The Forkhead box M1 protein regulates the transcription of the estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.*
- Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Mejean 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.
- Marsh KE, Creutz LM, Hawkins MB & Godwin J 2006 Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, *Thalassoma bifasciatum*: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase. *Brain Res.* **1126** 91-101.
- Martini PG, age-Mourroux R, Kraichely DM & Katzenellenbogen BS 2000 Prothymosin alpha selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity. *Mol.Cell Biol.* **20** 6224-6232.
- Maruo K, Suda M, Yokoyama S, Oshima Y & Nakamura M 2008 Steroidogenic gene expression during sex determination in the frog *Rana rugosa*. *Gen.Comp Endocrinol.* **158** 87-94.
- 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.
- Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau EL, Hamaguchi S, Sakaizumi M & Nagahama Y 2007 DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104** 3865-3870.
- Matsumoto T, Shiina H, Kawano H, Sato T & Kato S 2008 Androgen receptor functions in male and female physiology. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **109** 236-241.
- Matsumoto T, Takeyama K, Sato T & Kato S 2005 Study of androgen receptor functions by genetic models. *J.Biochem.(Tokyo)* **138** 105-110.
- Matsuoka MP, van NS, Andersen O, Benfey TJ & Reith M 2006 Real-time PCR analysis of ovary- and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **144** 128-135.
- Mayer LP, Dyer CA & Propper CR 2003 Exposure to 4-tert-octylphenol accelerates sexual differentiation and disrupts expression of steroidogenic factor 1 in developing bullfrogs. *Environ.Health Perspect.* **111** 557-561.
- Mayer LP, Overstreet SL, Dyer CA & Propper CR 2002 Sexually dimorphic expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) in developing gonads of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen.Comp Endocrinol.* **127** 40-47.
- McLaren A & Southee D 1997 Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev.Biol.* **187** 107-113.
- Menuet A, Anglade I, Flouriot G, Pakdel F & Kah O 2001 Tissue-specific expression of two structurally different estrogen receptor alpha isoforms along the female reproductive axis of an oviparous species, the rainbow trout. *Biol.Reprod.* **65** 1548-1557.
- Menuet A, Le PY, Torres O, Kern L, Kah O & Pakdel F 2004 Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2. *J.Mol.Endocrinol.* **32** 975-986.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O & Pakdel F 2002 Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol.Reprod.* **66** 1881-1892.
- Michael MD, Kilgore MW, Morohashi K & Simpson ER 1995 Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. *J.Biol.Chem.* **270** 13561-13566.
- Miller WL 1988 Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr.Rev.* **9** 295-318.

- Milnes MR, Bryan TA, Medina JG, Gunderson MP & Guillette LJ, Jr. 2005 Developmental alterations as a result of in ovo exposure to the pesticide metabolite p,p'-DDE in Alligator mississippiensis. *Gen.Comp Endocrinol.* **144** 257-263.
- Milnes MR, Jr., Roberts RN & Guillette LJ, Jr. 2002 Effects of incubation temperature and estrogen exposure on aromatase activity in the brain and gonads of embryonic alligators. *Environ.Health Perspect.* **110 Suppl 3** 393-396.
- Minervini F, Dell'Aquila ME, Maritato F, Minoia P & Visconti A 2001 Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol.In Vitro* **15** 489-495.
- Miyata S & Kubo T 2000 In vitro effects of estradiol and aromatase inhibitor treatment on sex differentiation in *Xenopus laevis* gonads. *Gen.Comp Endocrinol.* **119** 105-110.
- Morais da SS, 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.
- Mosselman S, Polman J & Dijkema R 1996 ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* **392** 49-53.
- Muscattelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W & . 1994 Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* **372** 672-676.
- Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T & Mizuno S 1998 Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J.Mol.Endocrinol.* **20** 193-202.
- Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, Nagahama Y & Shibata N 2006 Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **344** 353-361.
- Nakamoto M, Wang DS, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y & Shibata N 2007 Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. *Mol.Reprod.Dev.*
- National Resources Defense Council. 1998 Endocrine Disruptors. <http://www.nrdc.org/health/effects/qendoc.asp>
- Nef S & Parada LF 2000 Hormones in male sexual development. *Genes Dev.* **14** 3075-3086.
- Nesaretnam K, Corcoran D, Dils RR & Darbre P 1996 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo. *Mol.Endocrinol.* **10** 923-936.
- Newbold RR, Padilla-Banks E & Jefferson WN 2006 Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology* **147** S11-S17.
- Nguyen P, Cui H, Bisht KS, Sun L, Patel K, Lee RS, Kugoh H, Oshimura M, Feinberg AP & Gius D 2008 CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res.* **68** 5546-5551.
- Nimrod AC & Benson WH 1997 Xenobiotic interaction with and alteration of channel catfish estrogen receptor. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **147** 381-390.
- Nomura O, Nakabayashi O, Nishimori K, Yasue H & Mizuno S 1999 Expression of five steroidogenic genes including aromatase gene at early developmental stages of chicken male and female embryos. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **71** 103-109.
- Ogino Y, Katoh H & Yamada G 2004 Androgen dependent development of a modified anal fin, gonopodium, as a model to understand the mechanism of secondary sexual character expression in vertebrates. *FEBS Lett.* **575** 119-126.
- Ohtani H, Miura I & Ichikawa Y 2003 Role of aromatase and androgen receptor expression in gonadal sex differentiation of ZW/ZZ-type frogs, *Rana rugosa*. *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* **134** 215-225.
- Oka T, Adati N, Shinkai T, Sakuma K, Nishimura T & Kurose K 2003 Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **312** 877-882.
- Oka T, Tooi O, Mitsui N, Miyahara M, Ohnishi Y, Takase M; Kashiwagi A, Shinkai T, Santo N, Iguchi T 2008.

- Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquat. Toxicol.* **87**, 215-226.
- Okada A, Ohta Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M & Iguchi T 2003 Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats. *J.Mol.Endocrinol.* **30** 301-315.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW 1995 Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270** 1354-1357.
- Oreal E, Mazaud S, Picard JY, Magre S & Carre-Eusebe D 2002 Different patterns of anti-Mullerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Dev.Dyn.* **225** 221-232.
- Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D & Magre S 1998 Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev.Dyn.* **212** 522-532.
- Osawa N, Oshima Y & Nakamura M 2005 Molecular cloning of *Dmrt1* and its expression in the gonad of *Xenopus*. *Zoolog.Sci.* **22** 681-687.
- Oshima Y, Hayashi T, Tokunaga S & Nakamura M 2005 *Wnt4* expression in the differentiating gonad of the frog *Rana rugosa*. *Zoolog.Sci.* **22** 689-693.
- Ostby J, Kelce WR, Lambright C, Wolf CJ, Mann P & Gray LE, Jr. 1999 The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicol.Ind.Health* **15** 80-93.
- 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.
- Paeck K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ & Scanlan TS 1997 Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277** 1508-1510.
- Pakdel F, Metivier R, Flouriot G & Valotaire Y 2000 Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene. *Endocrinology* **141** 571-580.
- Pang Y, Dong J & Thomas P 2008 Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker GPR30 and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. *Endocrinology*.
- Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pepin 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.
- Paolucci M 2003 An androgen receptor in the brain of the green frog *Rana esculenta*. *Life Sci.* **73** 265-274.
- Paris J, Thevenot R & Wisniewska T 1973 [Quantitative evaluation of steroid estrogens by study of the vaginal epithelium thickness and mitotic index in mice]. *C.R.Seances Soc.Biol.Fil.* **167** 1004-1009.
- Parker KL & Schimmer BP 2002 Genes essential for early events in gonadal development. *Ann.Med.* **34** 171-178.
- 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.
- Pasteur G et Bons J 1959 Les Batraciens du Maroc. *Trav. Inst. Sci. Chérif*, Rabat, série Zool. **17**, 241p.
- Paulson KE, Darnell JE, Jr., Rushmore T & Pickett CB 1990 Analysis of the upstream elements of the xenobiotic compound-inducible and positionally regulated glutathione S-transferase *Ya* gene. *Mol.Cell Biol.* **10** 1841-1852.
- Pearce V, Nawaz Z, Xiao W, Wiedenfeld D, Boyle N & Smith D 2003 4-ethoxymethylphenol: a novel phytoestrogen that acts as an agonist for human estrogen receptors. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **84** 431-439.
- Perlman WR, Ramachandran B & Arnold AP 2003 Expression of androgen receptor mRNA in the late embryonic and early posthatch zebra finch brain. *J.Comp Neurol.* **455** 513-530.
- Petit FG, Metivier R, Valotaire Y & Pakdel F 1999 Synergism between a half-site and an imperfect estrogen-responsive element, and cooperation with COUP-TFI are required for estrogen receptor (ER) to achieve a maximal estrogen-stimulation of rainbow trout ER gene. *Eur.J.Biochem.* **259** 385-395.

- Pettersson I & Berg C 2007 Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. *Environ.Toxicol.Chem.* **26** 1005-1009.
- Pickford DB & Morris ID 2003 Inhibition of gonadotropin-induced oviposition and ovarian steroidogenesis in the African clawed frog (*Xenopus laevis*) by the pesticide methoxychlor. *Aquat.Toxicol.* **62** 179-194.
- Pieau C & Dorizzi M 2004 Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J.Endocrinol.* **181** 367-377.
- Piferrer F, Blazquez M, Navarro L & Gonzalez A 2005 Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen.Comp Endocrinol.* **142** 102-110.
- Pocar P, Brevini TA, Fischer B & Gandolfi F 2003 The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction.* **125** 313-325.
- Ponglikitmongkol M, White JH & Chambon P 1990 Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J.* **9** 2221-2231.
- Prueitt RL & Zinn AR 2001 A fork in the road to fertility. *Nat.Genet.* **27** 132-134.
- Quattrochi LC & Tukey RH 1993 Nuclear uptake of the Ah (dioxin) receptor in response to omeprazole: transcriptional activation of the human CYP1A1 gene. *Mol.Pharmacol.* **43** 504-508.
- 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.
- Reddy GP, Barrack ER, Dou QP, Menon M, Pelley R, Sarkar FH & Sheng S 2006 Regulatory processes affecting androgen receptor expression, stability, and function: potential targets to treat hormone-refractory prostate cancer. *J.Cell Biochem.* **98** 1408-1423.
- Reid G, Metivier R, Lin CY, Denger S, Ibberson D, Ivacevic T, Brand H, Benes V, Liu ET & Gannon F 2005 Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A. *Oncogene* **24** 4894-4907.
- Rhen T & Crews D 2001 Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA in the brain and reproductive tissues of the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J.Comp Neurol.* **437** 385-397.
- Rhen T, Sakata JT & Crews D 2005 Effects of gonadal sex and incubation temperature on the ontogeny of gonadal steroid concentrations and secondary sex structures in leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *Gen.Comp Endocrinol.* **142** 289-296.
- Rhodes S, Farwell A, Hewitt LM, Mackinnon M & Dixon DG 2005 The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicol.Environ.Saf* **60** 247-258.
- Rochira V, Granata AR, Madeo B, Zirilli L, Rossi G & Carani C 2005 Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years? *Asian J.Androl* **7** 3-20.
- Rody A, Holtrich U, Solbach C, Kourtis K, von MG, Engels K, Kissler S, Gatje R, Karn T & Kaufmann M 2005 Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocr.Relat Cancer* **12** 903-916.
- Sabo-Attwood T, Kroll KJ & Denslow ND 2004 Differential expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol. *Mol.Cell Endocrinol.* **218** 107-118.
- Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharia A, Kotcherguina I, Fujimoto S & Dahiya R 2002 Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **94** 384-390.
- Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H & Kobayashi K 2003 Fish full life-cycle testing for the weak estrogen 4-tert-pentylphenol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ.Toxicol.Chem.* **22** 1487-1496.
- Sekido R & Lovell-Badge R 2008 Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* **453** 930-934.
- Selcer KW, Smith S, Clemens JW & Palmer BD 2005 Androgen receptor in the oviduct of the turtle, *Trachemys*

- scripta. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **141** 61-70.
- Sharpe RM 1993 Declining sperm counts in men--is there an endocrine cause? *J.Endocrinol.* **136** 357-360.
- Sharpe RM 2006 Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* **20** 91-110.
- Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL & Ingraham HA 1994 Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* **77** 651-661.
- Shibata K, Takase M & Nakamura M 2002 The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen.Comp Endocrinol.* **127** 232-241.
- Shoemaker C, Ramsey M, Queen J & Crews D 2007a Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev.Dyn.* **236** 1055-1063.
- Shoemaker CM, Queen J & Crews D 2007b Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Mol.Endocrinol.* **21** 2750-2763.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, 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, Smith MJ & Sinclair AH 1999 Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* **234** 395-402.
- Smith CL 1998 Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol.Reprod.* **58** 627-632.
- Socorro S, Power DM, Olsson PE & Canario AV 2000 Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. *J.Endocrinol.* **166** 293-306.
- Sohoni P & Sumpter JP 1998 Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J.Endocrinol.* **158** 327-339.
- Stark K, Vainio S, Vassileva G & McMahon AP 1994 Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* **372** 679-683.
- Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW & Mancini MA 2001 FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat.Cell Biol.* **3** 15-23.
- Stoker TE, Cooper RL, Lambright CS, Wilson VS, Furr J & Gray LE 2005 In vivo and in vitro anti-androgenic effects of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **207** 78-88.
- Stoll R, Ichas F, Fauconau N & Maraud R 1993 Action of estradiol and tamoxifen on the Mullero-regressive activity of the chick embryonic testis assayed in vivo by organotypic grafting. *Anat.Embryol.(Berl)* **187** 379-384.
- Sun L, Huang L, Nguyen P, Bisht KS, Bar-Sela G, Ho AS, Bradbury CM, Yu W, Cui H, Lee S, Trepel JB, Feinberg AP & Gius D 2008 DNA methyltransferase 1 and 3B activate BAG-1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation. *Cancer Res.* **68** 2726-2735.
- Takahashi O, Oishi S, Yoneyama M, Ogata A & Kamimura H 2007 Antiestrogenic effect of paradichlorobenzene in immature mice and rats. *Arch.Toxicol.* **81** 505-517.
- Takase M, Noguchi S & Nakamura M 2000 Two Sox9 messenger RNA isoforms: isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa*. *FEBS Lett.* **466** 249-254.
- Tamura H, Yoshikawa H, Gaido KW, Ross SM, DeLisle RK, Welsh WJ & Richard AM 2003 Interaction of organophosphate pesticides and related compounds with the androgen receptor. *Environ.Health Perspect.* **111** 545-552.
- Tang B & Jiang J 2005 [Study of the CpG methylation status of ER alpha gene in estrogen receptor alpha-negative breast cancer cell lines and the role of hydralazine demethylation]. *Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi.* **34** 283-287.

- Thornton JW & Kelley DB 1998 Evolution of the androgen receptor: structure-function implications. *Bioessays* **20** 860-869.
- Tiffoche C, Chesnel A, Jego P & Le Pennec JP 1993 Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a Pleurodeles lectin. *Eur.J.Biochem.* **213** 901-907.
- Todo T, Ikeuchi T, Kobayashi T & Nagahama Y 1999 Fish androgen receptor: cDNA cloning, steroid activation of transcription in transfected mammalian cells, and tissue mRNA levels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **254** 378-383.
- Tollefsen KE 2002 Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat.Toxicol.* **56** 215-225.
- Tollefsen KE, Ovrevik J & Stenersen J 2004 Binding of xenoestrogens to the sex steroid-binding protein in plasma from Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* **139** 127-133.
- Tomy S, Wu GC, Huang HR, Dufour S & Chang CF 2007 Developmental expression of key steroidogenic enzymes in the brain of protandrous black porgy fish, *Acanthopagrus schlegeli*. *J.Neuroendocrinol.* **19** 643-655.
- Torres Maldonado LC, Landa PA, Moreno MN, Marmolejo VA, Meza MA & Merchant LH 2002 Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen.Comp Endocrinol.* **129** 20-26.
- Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung BC & Place AR 2001 Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J.Exp.Zool.* **290** 475-483.
- Tyler CR, Jobling S & Sumpter JP 1998 Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev.Toxicol.* **28** 319-361.
- Urbatzka R, Lutz I & Kloas W 2007 Aromatase, steroid-5-alpha-reductase type 1 and type 2 mRNA expression in gonads and in brain of *Xenopus laevis* during ontogeny. *Gen.Comp Endocrinol.*
- Vaillant S, Dorizzi M, Pieau C & Richard-Mercier N 2001 Sex reversal and aromatase in chicken. *J.Exp.Zool.* **290** 727-740.
- Vaillant S, Guemene D, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N & Brillard JP 2003 Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (*Gallus domesticus*) treated with Fadrozole. *Mol.Reprod.Dev.* **65** 420-428.
- Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N & McMahon AP 1999 Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **397** 405-409.
- van Royen ME, Cunha SM, Brink MC, Mattern KA, Nigg AL, Dubbink HJ, Verschure PJ, Trapman J & Houtsmuller AB 2007 Compartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells. *J.Cell Biol.* **177** 63-72.
- van NS & Andersen O 2006 Temperature effects on sex determination and ontogenetic gene expression of the aromatases *cyp19a* and *cyp19b*, and the estrogen receptors *esr1* and *esr2* in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol.Reprod.Dev.* **73** 1481-1490.
- Van WK, De CN, Vermeulen L, Schoonjans F & Comhaire F 1996 Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Hum.Reprod.* **11** 325-329.
- Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK & Lupu R 1998 Expression of estrogen receptor beta messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res.* **58** 210-214.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E & . 1994 Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79** 1111-1120.
- Wallace H & Wallace BM 2000 Sex reversal of the newt *Triturus cristatus* reared at extreme temperatures. *Int.J.Dev.Biol.* **44** 807-810.
- Wallacides A, Chesnel A, Chardard D, Fament S and Dumond H*. RA triggers meiosis entry in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*.
- Wang DS, Kobayashi T, Zhou LY, Paul-Prasanth B, Ijiri S, Sakai F, Okubo K, Morohashi K & Nagahama Y 2007

- Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol.Endocrinol.* **21** 712-725.
- Wang F, Samudio I & Safe S 2001 Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol.Cell Endocrinol.* **172** 91-103.
- Wang MH & Baskin LS 2008 Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias. *J.Androl* **29** 499-505.
- Wennstrom KL, Gill CJ & Crews D 2003 Sex differences in estrogen-induced progesterone and estrogen receptor mRNA in the ventromedial hypothalamus of hatchling whiptail lizards. *Brain Res.Dev.Brain Res.* **145** 151-157.
- Westberry JM, Prewitt AK & Wilson ME 2008 Epigenetic regulation of the estrogen receptor alpha promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats. *Neuroscience* **152** 982-989.
- Western PS, Harry JL, Graves JA & Sinclair AH 1999a Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev.Dyn.* **216** 411-419.
- Western PS, Harry JL, Graves JA & Sinclair AH 1999b Temperature-dependent sex determination: upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Dev.Dyn.* **214** 171-177.
- Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA & Haussler MR 1999 Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J.Cell Biochem. Suppl* **32-33** 110-122.
- Wibbels T, Cowan J & LeBoeuf R 1998 Temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J.Exp.Zool.* **281** 409-416.
- Wilson ME, Westberry JM & Prewitt AK 2008 Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha gene expression in the brain: a role for promoter methylation? *Front Neuroendocrinol.* **29** 375-385.
- World Health Organization (WHO). 2002 *Global Assessment of the state-of-the-science of Endocrine Disruptors*. WHO/PCS/EDC/02.2. International Program on Chemical Safety.
- Wu KH, Tobias ML, Thornton JW & Kelley DB 2003 Estrogen receptors in *Xenopus*: duplicate genes, splice variants, and tissue-specific expression. *Gen.Comp Endocrinol.* **133** 38-49.
- Yamamoto I, Tsukada A, Saito N & Shimada K 2003 Profiles of mRNA expression of genes related to sex differentiation of the gonads in the chicken embryo. *Poult.Sci.* **82** 1462-1467.
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K & Takatsuki M 2003 Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* **183** 93-115.
- Yeap BB, Wilce JA & Leedman PJ 2004 The androgen receptor mRNA. *Bioessays* **26** 672-682.
- 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.U.S.A* **105** 2469-2474.
- You L, Chan SK, Bruce JM, rchibeque-Engle S, Casanova M, Corton JC & Heck H 1999 Modulation of testosterone-metabolizing hepatic cytochrome P-450 enzymes in developing Sprague-Dawley rats following in utero exposure to p,p'-DDE. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **158** 197-205.
- Zhou LY, Wang DS, Shibata Y, Paul-Prasanth B, Suzuki A & Nagahama Y 2007 Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **362** 619-625.
- Zhou R, Liu L, Guo Y, Yu H, Cheng H, Huang X, Tiersch TR & Berta P 2003 Similar gene structure of two Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol.Reprod.Dev.* **66** 211-217.
- Zhou ZX, Kempainen JA & Wilson EM 1995a Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Mol.Endocrinol.* **9** 605-615.
- Zhou ZX, Lane MV, Kempainen JA, French FS & Wilson EM 1995b Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol.Endocrinol.* **9** 208-218.

Zitzmann M, Gromoll J & Nieschlag E 2005 The androgen receptor CAG repeat polymorphism. *Andrologia* **37** 216.

Zitzmann M & Nieschlag E 2003 The CAG repeat polymorphism within the androgen receptor gene and maleness. *Int.J.Androl* **26** 76-83.

Annexe 1

Female-enriched and thermosensitive expression of steroidogenic factor-1 during gonadal differentiation in *Pleurodeles waltl*

S Kuntz, D Chardard, C-I Ko, H Dumond, M Ducatez, M Callier, S Flament and A Chesnel

EA 3442: Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Reproduction et du Développement, Université Henri Poincaré-Nancy 1, Faculté des Sciences, BP239, Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandœuvre lès nancy CEDEX, France

(Requests for offprints should be addressed to S Flament; Email: Stephane.Flament@scbiol.uhp-nancy.fr)

Abstract

In the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*, sex differentiation is genetically controlled, that is, ZZ male vs ZW female, but may be influenced by temperature, which induces a female-to-male sex reversal. We investigated whether steroidogenic factor 1 (SF-1) could be involved in *Pleurodeles* sex differentiation or in temperature-dependent sex reversal by cloning a *Pleurodeles* SF-1 cDNA and examining its developmental expression. The 468-amino-acid deduced protein is highly conserved in comparison with other species. In ZZ and ZW control larvae, SF-1 mRNA is detected at the first stage of the thermosensitive period (TSP) in the gonad–mesonephros–interrenal complex (GMI). By the end of TSP at stage 55, SF-1 is expressed in the gonad (Gd) and in the mesonephros-interrenal (MI) both in ZZ and ZW larvae. During this stage, a transient, ZW-specific increase of SF-1 transcription occurs not only in Gd but also in MI, this increase starting earlier in Gd than in MI. Therefore, in *P. waltl*, an SF-1 upregulation occurs after the onset of the ovarian-specific increase of aromatase mRNA expression. At the end of metamorphosis, the SF-1 transcription level in Gd and MI is nearly the same in both ZZ and ZW larvae. Besides, after long-term heat treatment leading to sex reversal, SF-1 mRNA upregulation is not observed in ZW larvae, in either Gd or MI. However, SF-1 expression is not decreased after a 48-h heat shock applied at the end of the TSP, suggesting that temperature has no inhibitory effect by itself in long-term heat treatment. Estradiol benzoate treatments show that, at the end of the TSP, SF-1 gene transcription could be controlled by the estrogen level. This is in accordance with the female-enriched SF-1 expression and the decreased SF-1 expression following long-term, sex-reversing heat treatment, which is known to decrease aromatase expression and activity. Thus, it is unlikely that SF-1 is directly involved in *Pleurodeles* temperature-dependent sex reversal.

Journal of Molecular Endocrinology (2006) **36**, 175–186

Introduction

The steroidogenic factor-1 gene (SF-1) encodes a nuclear orphan receptor belonging to the nuclear receptor superfamily (Lala *et al.* 1992, Whitfield *et al.* 1999). In various species, SF-1 is known to be expressed in several tissues involved in steroidogenesis and/or reproduction, such as the adrenal glands in mammals and corresponding organs in other species, such as the interrenal tissue in amphibians (Mayer *et al.* 2002) as well as brain and gonad (Val *et al.* 2003). SF-1 plays a key role in the development of both the hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes (Ikeda *et al.* 1993), since mice with a SF-1 gene homozygous disruption show complete adrenal and gonadal agenesis and ventromedial hypothalamus dysgenesis (Luo *et al.* 1994, Ikeda *et al.* 1995, Shinoda *et al.* 1995). A failure of gonad and adrenal development has also been detected in a human case of male-to-female sex reversal exhibiting a heterozygote mutation in the SF-1 gene (Achermann *et al.* 1999). Furthermore, the SF-1^(-/-) XY

mice have a female phenotype (Luo *et al.* 1994). These results agree with an early expression of SF-1 in the genital ridges of both sexes throughout the undifferentiated stage (Ikeda *et al.* 1994), leading to adrenal formation and gonadal differentiation (Schnabel *et al.* 2003). At a later stage of development, as histologic sex differentiation of the gonad begins, several vertebrate species exhibit a sexually dimorphic gonadal expression of SF-1 in their developing gonads. A higher level of SF-1 mRNA is found in the male differentiating gonad in mouse (Ikeda *et al.* 1994), rat (Hatano *et al.* 1994), man (Hanley *et al.* 2000), pig (Pilon *et al.* 1998) and turtle (Wibbels *et al.* 1998), whereas an opposite situation is observed in chicken (Smith *et al.* 1999), alligator (Western *et al.* 2000) and American bullfrog (Mayer *et al.* 2002). In mammals, SF-1 controls the expression of many enzymes required for steroid hormone production, including aromatase (Parker & Schimmer 2002). For instance, in rat and man, SF-1 binds to the aromatase promoter and activates its transcription (Lynch *et al.* 1993, Michael *et al.* 1995). SF-1-binding sites have also

been identified in the promoter region of aromatase gene in chicken (Kudo *et al.* 1996), *Xenopus* (Akatsuka *et al.* 2005), and many teleost fishes (Tanaka *et al.* 1995, Tong & Chung 2003, Yoshiura *et al.* 2003, Gardner *et al.* 2005). Alternatively, estrogen could also control SF-1 transcription, as suggested in the red-eared slider turtle model (Fleming & Crews 2001), in which estradiol treatment was shown to produce SF-1 upregulation, although it was not proved that the effect was direct or indirect.

In the urodele amphibian *Pleurodeles waltli*, steroid hormones play a role in sex differentiation since the application of estradiol to the rearing water during a hormone-sensitive period induces ZZ genetic male larvae to differentiate into functional neofemales (Gallien 1951). Moreover, a similar treatment performed with an aromatase inhibitor can induce a complete female-to-male sex reversal (Chardard & Dournon 1999), demonstrating that the aromatase enzymatic complex plays a very important part in the process of female differentiation (Kuntz *et al.* 2003a). Indeed, aromatase activity measurements in gonad revealed up to 40-fold higher activity in ZW larvae than in their ZZ counterparts at the onset of ovarian differentiation (Chardard *et al.* 1995). However, the gonadal level of endogenous aromatase transcripts in ZW larvae was only 1.5-fold higher than in ZZ, suggesting the involvement of an unknown post-transcriptional regulation (Kuntz *et al.* 2003b).

Temperature can also interfere with the ZZ/ZW genetic sex determination and sex ratio, since ZW larvae reared at 32 °C during the thermosensitive period (TSP) differentiate into functional neomales (Dournon & Houillon 1984). The masculinizing temperature was shown to inhibit aromatase activity (Chardard *et al.* 1995) and could act as a direct or indirect repressor of estrogen synthesis, since estradiol benzoate can counteract the masculinizing effect of a high rearing temperature (Zaborski 1986).

Since the aromatase gene is differentially expressed during sexual differentiation and considering that this expression can be indirectly affected by temperature, we focused our attention on SF-1, a known potential regulator of aromatase. We first isolated SF-1 cDNA containing a putative open reading frame. Expression analysis during gonadal development of ZZ and ZW larvae revealed the presence of SF-1 mRNA early during the TSP in the gonad–mesonephros–interrenal complex (GMI), either when aromatase mRNA is present in low amounts in the undifferentiated gonad (Gd) or at the time of aromatase expression increase in ZW larvae. A transient, female-specific upregulation of SF-1 expression was observed at the end of TSP, not only in Gd but also in the mesonephros–interrenal (MI), suggesting a role of SF-1 in the differentiating ovary and in mesonephric or interrenal steroid synthesis. Amounts

of SF-1 mRNAs were significantly decreased in ZW larvae subjected to long-term sex-reversing heat treatment, in either Gd or MI, but not in the brain. However, these changes in SF-1 gene expression, rather than being directly regulated by temperature during the TSP, seem to be related to changes in aromatase mRNA expression and activity leading to low estrogen levels. Indeed, estradiol benzoate treatments of ZZ larvae clearly induce upregulation of SF-1 mRNA expression. Therefore, SF-1 does not appear to be directly involved in temperature-dependent sex-reversal in *Pleurodeles*.

Materials and methods

Animals

Adult *P. waltli* were reared in fresh water at a controlled temperature of 20 ± 2 °C in our laboratory (standard ZW²⁰ and ZZ²⁰). The ZW or ZZ sexual genotype was determined by electrophoretic patterning of the two W- and/or Z-linked peptidase-1 isoforms, as described previously (Chardard *et al.* 1995). Developmental stages were determined by macroscopic observation according to Gallien and Durocher (1957). Stage 55 lasts about 2 months and was chronologically subdivided into stage 55, stage 55+15 days (55^{15d}) and stage 55+30 days (55^{30d}). The TSP from stage 42 to 54 is defined as the period while ZW larvae must be reared at 32 °C in order to obtain 100% sex reversal (Dournon & Houillon 1984). Heat treatment of ZW larvae was run at 32 °C (ZW³²) during the TSP while other ZW or ZZ larvae were maintained at 20 ± 2 °C as a control (ZW²⁰, ZZ²⁰). Heat shocks of 32 °C were applied to ZW larvae (ZW^{hs}) for 48 h at stages 55 and 55^{30d}. Hormonal treatment was run by rearing ZZ larvae at stages 55 and 55^{30d} for 48 h in fresh water containing estradiol benzoate (100 µg/l). Before dissection, animals were anesthetized in a solution of benzocaine (0.03%), and the brain, Gd, MI or GMI was dissected for further analysis. Due to their small size, Gd could not be isolated from the MI before stage 55^{15d}.

SF-1 cDNA isolation

Total RNA (1 µg) from adult testis was reverse transcribed with oligo(dT₁₅) primers and Superscript II mouse Moloney leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Invitrogen). An aliquot of the reaction was amplified by PCR with the degenerated primers Sf1, Sf2 and Sf4 (Table 1). The amplification was performed in the presence of 0.1 unit Taq DNA polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each dNTP and 3.5 mM MgCl₂. A 60 °C to 40 °C touchdown PCR program was run at 94 °C for 3 min followed by 20 cycles at 94 °C for 1 min, annealing for 1 min and 72 °C for 1 min. Amplification was then

Table 1 List of PCR primers used

Gene(*)	Name	Primer sequence
SF-1	Sf1	5'-TGYAARGGITTYYTAAARMGIAC-3'
SF-1	Sf2	5'-AARTTYGGICCIATGTAYAA-3'
SF-1	Sf4	5'-TCISWCCARCARTTYTG-3'
SF-1	Sf1-5R	5'-CTGGTCGGCCATCTTGCACATGAGGCC-3'
SF-1	Sf1-3R	5'-CTGGAAGCGGTGCGGGCAGACAGG-3'
SF-1	Sf1-1	5'-GGGTACACCTACCCACACTT-3'
SF-1	Sf1-5	5'-TCTTGGCCTGTGACCAGGAG-3'
Aromatase	Arom-1	5'-ATTGCAGCACCTGACACGAT-3'
Aromatase	Arom-6	5'-TTGTTCTGTACATTCTCTAA-3'
GAPDH	fwd	5'-ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3'
GAPDH	rev	5'-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3'

(*) Aromatase and GAPDH primers were used as a control in RT-PCR analysis of SF-1 expression.

pursued with 30 cycles at 94 °C for 1 min, 40 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. Two independent PCR products of 657 and 800 bp were obtained by using two different sets of primers, Sf2/Sf4 and Sf1/Sf4 respectively (Table 1). After separation on agarose gel electrophoresis, the expected fragments were purified, inserted into the plasmid pCR2 (Invitrogen) and transfected in *E. coli* INV α strain (Invitrogen), and both were sequenced (Genome Express, Meylan, France).

The 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) system (SMART RACE cDNA amplification kit; Clontech) was used to amplify the 5'-end and 3'-end of SF-1 cDNA synthesized from 1 μ g total RNA isolated from adult testis according to the manufacturer's instructions. PCR was performed with 1 unit Taq DNA polymerase (Advantage 2 Polymerase Mix; Clontech) and specific primer for each amplification in the 5'-end and 3'-end regions (Sf1-5R and Sf1-3R respectively) (Table 1). The reaction mixture was heated at 94 °C for 3 min and amplified for the first five cycles as follows: 94 °C for 30 s and 72 °C for 3 min. The next five cycles were 94 °C for 30 s, 70 °C for 30 s and 72 °C for 3 min. The remaining 30 cycles of PCR were carried out at 94 °C for 30 s, 68 °C for 30 s and 72 °C for 3 min, with a final extension at 72 °C for 10 min. Two fragments of 0.9 and 1.2 kb, isolated from the 5' and 3' regions respectively, were purified (QiaEX II Kit; Qiagen), inserted into the plasmid pGEM-T Easy (Promega), transfected into *E. coli* TG1 strain and sequenced (Genome Express).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses

The detailed protocol for RT has been previously described (Kuntz *et al.* 2003b). Total RNA was extracted from dissected tissues with TRIzol reagent (Invitrogen) and quantified (BioPhotometer; Eppendorf, Le Pecq,

France). Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed with random hexanucleotide primers and 100 units MMLV reverse transcriptase in a total volume of 25 μ l. A 2 μ l aliquot of resultant cDNA was PCR amplified with 0.1 unit of Taq DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂ and 0.4 pM of each primer in a total volume of 25 μ l. RT-PCR analyses were performed on 'n' samples (n is given in figures and tables), each sample comprising a pool of four or five individuals. Specific primers for *P. waltl* were Sf1-1 and Sf1-5, leading to a PCR product of 462 bp in length. The specific primers for the aromatase cDNA were Arom-1 and Arom-6, and the resulting PCR product was 510 bp in length. All the PCR products encompassed one exon/intron boundary based on other vertebrate gene alignments (not shown). To ensure that the RNA was not degraded and to prevent poor transcription quality, GAPDH cDNA was used as a control (see primer sequence in Table 1). The PCR conditions were 30-s denaturation at 94 °C, and 30-s annealing and 2-min elongation at 72 °C, and led to a 290 bp fragment. Annealing temperatures were 52 °C for GAPDH and aromatase primers, and 60 °C for SF-1 primers. We performed 35 cycles for qualitative analyses and 26 or 28 cycles for semiquantitative analyses in Gd and brain respectively. PCR products were then separated in a 1% agarose gel and transferred to nylon membrane (Hybond-N, Amersham) before hybridization with DIG-labeled probes and detection by chemoluminescence under previously described conditions (Kuntz *et al.* 2003b). Semiquantitative RT-PCR analysis was performed by running 28 or 30 PCR cycles for mRNA from Gd or MI respectively. PCR products were separated in agarose gel and compared with GAPDH level. In all cases, amplification was verified to take place in the linear phase of the PCR, and the intensity of the hybridization signal or agarose gel band was normalized to GAPDH by using the GelDoc 2000 (Bio-Rad) and a software package (Quantity One v.4.3.1; Bio-Rad).

Statistical analysis

The relative intensities of SF-1 and aromatase mRNAs were compared after normalization to GAPDH mRNA levels. The results are expressed as mean \pm S.E.M. of several measurements performed on different pools for each group, as indicated in the text. The variation of relative SF-1 mRNA expression between sexes (ZZ²⁰ and ZW²⁰ groups) was analyzed by comparison of means with Student's *t*-test. The statistical significance of SF-1 and aromatase mRNA expression regarding to temperature (ZW³² or ZW^{hs} and ZW²⁰ groups) was estimated by comparing means of the relative SF-1 or aromatase mRNA expression from each group by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Bonferroni multiple comparison procedure with SPSS 11.5 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

SF-1 is conserved in *P. waltl*

Pleurodeles SF-1 cDNA sequence (accession no. AY540336, not shown) was obtained by RT-PCR from total RNA extracted from adult testis. Two independent clones of 657 and 800 bp were obtained by degenerated PCR, using different set of primers (Table 1). Then, 5' and 3' RACE was performed in order to isolate the full-length SF-1 mRNA containing a putative 1407 bp open reading frame. The deduced amino-acid sequence was compared with SF-1 sequences from several species: *Rana rugosa*, *Trachemys scripta*, chicken, mouse and man (Fig. 1). The putative encoded polypeptide is composed of 468 amino acids and is related to that of *R. rugosa* although slightly longer than that of *T. scripta* (466 residues), mouse (462 residues) and man (461 residues). Overall sequence identity with *T. scripta* was 81%, with *R. rugosa* 79%, and with mouse and man 63% (Fig. 1). The conserved regions were identified by comparison with the corresponding regions in other species: the first and second zinc fingers corresponding to the DNA binding domain (residues 13–78), the Ad4 BP/SF-1 box (residues 79–106), region II (residues 274–315), region III (residues 364–387) and the AF-2 domain (residues 458–463). The identity rate of each functional domain in SF-1 was also examined. In contrast to the second zinc finger, the first one is highly conserved between species, except for *P. waltl*, which exhibits a single 15-valine-to-alanine amino-acid substitution. Nevertheless, the Pbox ESCKG localized in the first zinc finger is conserved in our model. SF-1 box, region II and region III present also a high degree of identity among most species (75–100%) while the AF-2 motif, essential for transcriptional activation, is entirely conserved. A proline stretch of 7–8 consecutive amino acids is present in the

mammalian SF-1 but absent in chicken, turtle, frog and *Pleurodeles*.

SF-1 is expressed during early gonadal development

The SF-1 mRNA expression pattern in the urogenital system of *Pleurodeles* larvae during the TSP was examined. Qualitative RT-PCR analysis in GMI from ZZ²⁰, ZW²⁰ and ZW³² larvae selected at different stages of their development showed that SF-1 is expressed early in the three types of larvae: SF-1 mRNAs are detected since stage 42, and their expression is maintained thereafter in a sex-independent manner through the whole TSP that ends at stage 54 (Fig. 2). Thus, SF-1 expression occurs before gonadal differentiation, which can be assessed at stage 53 by histologic examination. Besides, temperature appeared to have no silencing effect on SF-1 during this period of development.

Sex- and tissue-specificity of SF-1 expression during gonadal differentiation

SF-1 mRNA expressions were then compared by semiquantitative RT-PCR analyses performed from total RNA isolated either from GMI at stages 54 and 55, or from isolated Gd and MI taken at various subsets of stage 55 during which metamorphosis proceeds, and at stage 56 at which animals are metamorphosed (Table 2). The results were compared with those obtained in brain, another important, steroid-producing organ.

At stage 54, no significant difference could be detected between GMI from ZW²⁰ and ZZ²⁰ larvae. Then, SF-1 expression in GMI was higher in ZW²⁰ individuals with a 2.14-fold higher mRNA level at the beginning of stage 55. After this stage, the Gd was big enough to allow their dissection and their study independently of MI. We observed the expression of SF-1 to be higher in the ovary at stages 55^{15d} (1.55-fold) and 55^{30d} (1.19-fold). This female-enriched expression was transient, since, at stage 56, there was no significant difference between ZW²⁰ and ZZ²⁰ animals. Surprisingly, a high SF-1 expression was observed in female MI at stage 55^{30d} (2.15-fold), whereas no significant difference was found at stages 55^{15d} and 56. In the brain of ZW²⁰ larvae, SF-1 mRNA level observed inside and outside TSP, that is, at stages 54 and 55^{15d} respectively, was not significantly different from those in ZZ²⁰ ones.

Tissue-specific inhibition of SF-1 expression after long-term heat treatment

In order to test whether SF-1 mRNA expression is regulated by temperature, the SF-1 mRNA level in ZW³² larvae was compared with those measured in ZW²⁰ ones in Gd, MI, GMI and brain as before.

<i>P. waltl</i>	MEYTYDEDLDEL	CPACGDKVSGYHYGLLTCE	ESCKG	FFKRTVQNNKRYTCTENQT	CKIDKT	60			
<i>T. scripta</i>	MDYSYDEDPNQL	CPVCGDKVSGYHYGLLTCE	ESCKG	FFKRTVQNNKHYTCTESQN	SKIDKT	60			
<i>R. rugosa</i>	MDYSYDEDLDEL	CPVCGDKVSGYHYGLLTCE	ESCKG	FFKRTVQNNKRYTCTENQS	CKIDKT	60			
chicken	MDYSYDEDLDEL	CPVCGDKVSGYHYGLLTCE	ESCKG	FFKRTVQNNKHYTCTESQN	CKIDKT	60			
mouse	MDYSYDEDLDEL	CPVCGDKVSGYHYGLLTCE	ESCKG	FFKRTVQNNKHYTCTESQS	CKIDKT	60			
human	MDYSYDEDLDEL	CPVCGDKVSGYHYGLLTCE	ESCKG	FFKRTVQNNKHYTCTESQS	CKIDKT	60			
		Zinc finger I		Zinc finger II					
<i>P. waltl</i>	QRKRCPCYCRFQKCLTVGM	RLAVRADRMGRGSRNKF	FGPMYKRDRALK	QQKKALIRANGFKL	120				
<i>T. scripta</i>	QRKRCPCYCRFQKCLTVGM	RLAVRADRMGRGSRNKF	FGPMYKRDRALK	QQKKALIRANGFKL	120				
<i>R. rugosa</i>	QRKRCPCYCRFQKCLTVGM	RLAVRADRMGRGSRNKF	FGPMYKRDRALK	QQKKALIRANGIKL	120				
chicken	QRKCCPCYCRFQKCLTVGM	RLAVRADRMGRGSRNKF	FGPMYKRDRALK	QQKKALIRANGFKL	120				
mouse	QRKRCPCYCRFQKCLTVGM	RLAVRADRMGRGSRNKF	FGPMYKRDRALK	QQKKAQIRANGFKL	120				
human	QRNRCPCYCRFQKCLTVGM	RLAVRADRMGRGSRNKF	FGPMYKRDRALK	QQKKAQIRANGFKL	120				
		Zinc finger II		Ad4BP/SF-1 box					
<i>P. waltl</i>	ETVPQIVSPTQTEYTI	PSNIHSIHSVSKSLPLNT	VAMTQVNYDRSPYGT	PSLGMTMP-NH	179				
<i>T. scripta</i>	ETVPQIVSPVQTDY	NLSSTIHHIHSVSKSL	PPNPATMTPVDYDR	SPYGTPSLGMTVP-SH	179				
<i>R. rugosa</i>	ETVPQIVSQVQTDY	SVANNIHTIHPVSKN	LPNTAPMTPVEYDR	SGYGPPIAMTLP-NH	179				
chicken	ETVPQIVSPVQNDY	GLSSTIHSIHAMA	KTLPPNPAALTPADY	ERGPYGTPSLAMTVP-GH	179				
mouse	ETGPPMGV	PPPPPPPD---	YMLPPSLHAPEPK	ALVSGPPSGPLGDFG	APSLPMAVPGPH	177			
human	ETGPPMGV	PPPPPPAPD---	YVLPSSLHGPEPK	GLAAGPPAGPLGDFG	APALPMAVPGAH	177			
<i>P. waltl</i>	GALQGYTYPHFPNRTI	KSEFPDHYSSPHES-	VAPAFVYSDAYQNS	FPPDIPETILNLLQL	238				
<i>T. scripta</i>	GALSSYHYPSFPNRTI	KSEYDPHYTNSHES-	--VASYMPDAYPNS	AAPPDIPDIVILKLLQL	237				
<i>R. rugosa</i>	APLSQYHYSSFSRTI	KSEYDPHYSNVHDP	STAGGYVYPEAYT	STSQPDIPDIVILKLLQL	239				
chicken	TPLAGYHYPSFPNRAI	KSEYDPHYSAHEA-	--VPTYAYPETY	PSSSPPDIPDIVILKLLQL	237				
mouse	GPLAGYLYPAFSNRTI	KSEYPEPYASPPQ-	---PGPPYSYPEP	FGGPNVPELILQLLQL	234				
human	GPLAGYLYPAFFGRAI	KSEYPEPYASPPQ-	---PGLPYGYPEP	FGGPNVPELILQLLQL	233				
<i>P. waltl</i>	EPDEPQIKARYLACL	QQEQGKSRHEKPP	STFGLMC	KMADQTLFSI	VEWARSCIYFKELEV	298			
<i>T. scripta</i>	EPDEPQVKVRI	LACLQQEQGKSRHEKLS-	TFGLMC	KMADQTLFSI	VEWARSCIFFKELEV	296			
<i>R. rugosa</i>	EPDEPQIKARI	ISCLQQEQNKSRHEKLS-	MFGLMC	KMADQTLFSI	VEWARSCIYFKELEV	298			
chicken	EPDEAQVKARI	LACLQQEQGKSRHEKLS-	TFGLMC	KMADQTLFSI	VEWARSCIFFKELEV	296			
mouse	EPDEEQVRRAR	IVGCLQEPAKSRSDQ	PAP--FSLLC	RMADQTFISI	VDWARCMVFKELEV	292			
human	EPDEEQVRRAR	ILGCLQEPKSRPDQ	PAA--FGLLC	RMADQTFISI	VDWARCMVFKELEV	291			
		Region II							
<i>P. waltl</i>	GDQMILLQNCWSELLVF	DHIYRQIQHGKENS	ILLVTGQE	IDVSTIAAQAG	PALNNLVLKS	358			
<i>T. scripta</i>	GDQMKLLQNCWSELLVF	DHIYRQVQHGKES	SMLLVTGQ	EVEMATIAAQAG	SNNLNLVLA	356			
<i>R. rugosa</i>	SDQMILLQNCWSELLVF	DHIYRQMHSKENS	ILLVTGQE	IELSAIAAQAG	STLNNLVLRA	358			
chicken	GDQMKLLQNCWSELLVF	DHVYRQLQHGKES	VLLVTGQ	EVDLSAVAAQAG	SILHSLVLA	356			
mouse	ADQMTLLQNCWSELLVL	DHIYRQVQYKEDS	ILLVTGQ	EVELSTVAVQAG	SLLHSLVLA	352			
human	ADQMTLLQNCWSELLVF	DHIYRQVQHGKES	ILLVTGQ	EVELTTVATQAG	SLLHSLVLA	351			
<i>P. waltl</i>	QELVI	QLHSLQVDRQEFV	CKFLILFSLD	EKCLNNTL	LARNAQEKINAAL	HEYTMCHYPH	418		
<i>T. scripta</i>	QELVL	HLHSLQVDRQEFV	CKFLILFSLD	VKYLENH	SLAKDAQEKANAAL	LEYTMCHYPH	416		
<i>R. rugosa</i>	QELVI	LLHSLQVDRQEFV	CKFLILFSLD	EKFLENH	SLAKSAQEKVDS	SALMEYTMCHYPH	418		
chicken	QELVL	HLHSPQVDRQEFV	CKFLILFSLD	VKYLENH	ALAKDAQEKANAAL	LEYTMCHYPH	416		
mouse	QELVL	QLHALQLDRQEFV	CKFLILFSLD	VKFLNNH	SLVKDAQEKANAAL	LDYTMCHYPH	412		
human	QELVL	QLLALQLDRQEFV	CKFLILFSLD	LKFLNNH	ILVKDAQEKANAAL	LDYTMCHYPH	411		
		Region III							
<i>P. waltl</i>	CMDKFRLLLLRL	TDIRSI	SMLAEDYLYHKHMS	GSEVP	CNN	LLIEML	HAKRS	468	100% identity
<i>T. scripta</i>	AADKFRQLLLRL	LAEIRSL	SMQAEYLYHKHLS	GSEVP	CNN	LLIEML	HAKRT	466	81% identity
<i>R. rugosa</i>	CTDKYRLLLLRL	LAEIRSI	SMQAEYLYHKHLS	GSEVP	CNN	LLIEML	HAKRA	468	79% identity
chicken	CTDKFRQLLLRL	TEVRALS	SMQAEYLYHKHLS	GSEVP	CNN	LLIEML	HAKRT	466	78% identity
mouse	CGDKFQQLLL	CLVEVRALS	SMQAEYLYHKHLS	GNEMPR	NN	LLIEML	QAKQT	462	63% identity
human	CGDKFQQLLL	CLVEVRALS	SMQAEYLYHKHLS	GNEMPR	NN	LLIEML	QAKQT	461	63% identity
		AF-2							

Figure 1 Alignment of the amino-acid sequences of SF-1 cDNAs from several vertebrate species. Amino-acid identity with *Pleurodeles* sequence is shown in gray. The conserved regions, zinc finger I, zinc finger II, Ad4BP (Ad4 binding protein)/SF-1 box, region II, region III and AF-2, are framed. The mammalian proline stretch is in boldface.

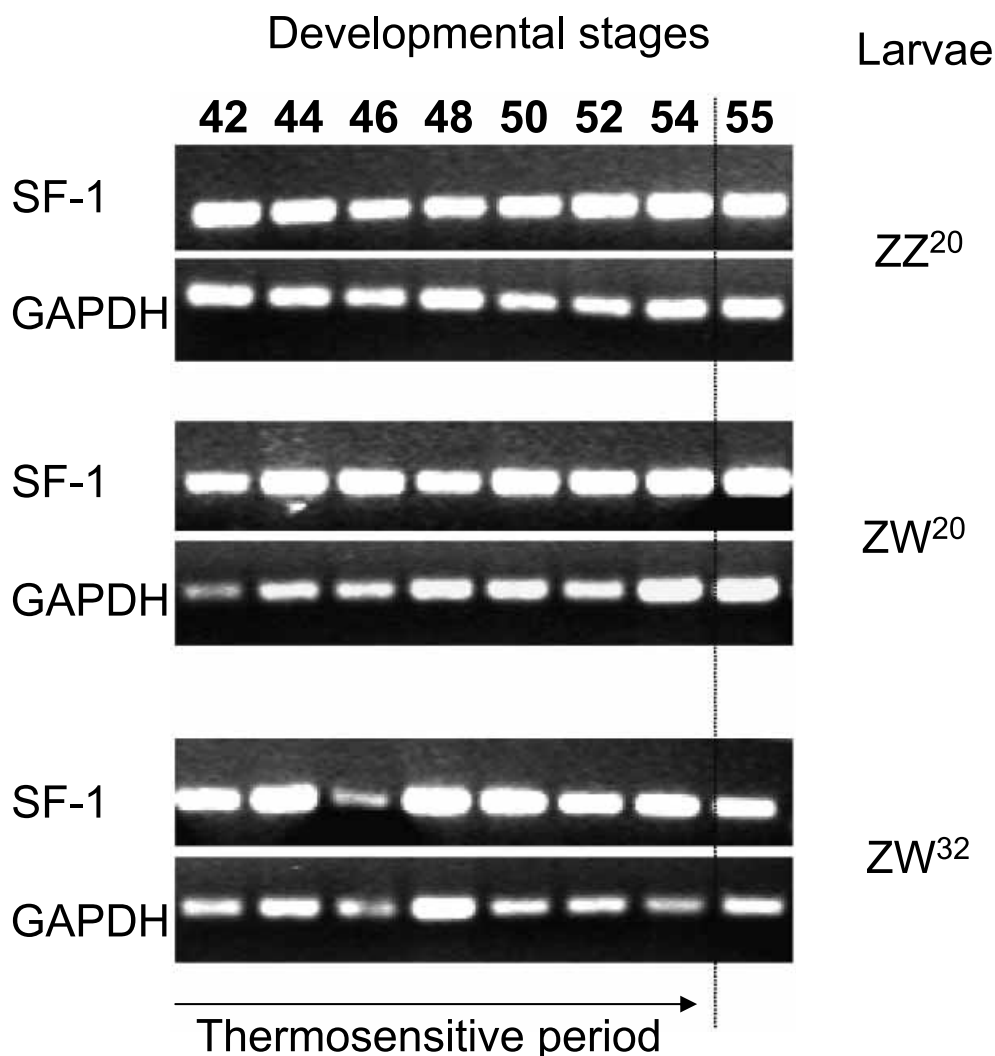


Figure 2 Analysis of SF-1 mRNA expression in *Pleurodeles* gonad-mesonephros-interrenal complex (GMI). ZZ and ZW larvae raised at 20 °C (ZZ²⁰ and ZW²⁰) and ZW larvae exposed at a temperature of 32 °C (ZW³²) were sampled at various stages of TSP (42–54) and at stage 55. Total RNA was extracted from a pool of GMI dissected from five larvae, reverse transcribed and amplified by PCR for 35 cycles. GAPDH mRNA level is used as a control.

At stage 54, no difference in SF-1 mRNA level was detected in GMI between ZW³² and ZW²⁰ larvae, whereas at stage 55^{15d}, a reduced expression (1.6-fold) was observed (Table 3). In Gd of larvae at the same stage (55^{15d}), a higher difference was observed between heat-treated larvae and controls, heat treatment leading to a 3.7-fold lower expression of SF-1. The inhibitory effect of heat treatment on gonadal SF-1 expression was confirmed at stage 55^{30d} (2.2-fold lower SF-1 mRNA level). Interestingly, at this stage, a similar situation was observed in MI: there was a 3.4-fold lower expression of SF-1 in this organ in ZW³² larvae. Therefore, heat treatment performed from stage 42 to 54 affects SF-1 expression not only in Gd but also in MI. Besides, this

effect appears late, after the end of the TSP. In the brain, SF-1 transcription is not temperature-sensitive either during the TSP (stage 54) or after the end of TSP (stage 55^{15d}).

Gonadal SF-1 expression is not inhibited by 48-h heat shock

The inhibition of SF-1 expression described above is observed after sex-reversing heat treatment is completed, suggesting that temperature does not act directly on SF-1 expression. In order to get more information about the relationship between temperature and SF-1 expression, a 48-h 32 °C heat shock was applied to ZW larvae

Table 2 ZW²⁰/ZZ²⁰ SF-1 mRNA expression ratio in gonad and/or mesonephros-interrenal and brain

Stage of larval development ⁽²⁾	SF-1 expression in ZW ²⁰ /SF-1 expression in ZZ ²⁰ ⁽¹⁾			
	GMI ⁽³⁾	Gonad	Mesonephros-interrenal	Brain
Stage 54	0.78 ⁽⁴⁾ <i>P</i> =0.434 ⁽⁶⁾ <i>n</i> (ZW ²⁰)=5; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=6	ND ⁽⁵⁾	ND	0.95 <i>P</i> =0.671 <i>n</i> (ZW ²⁰)=5; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=6
Stage 55	2.14 <i>P</i> =0.001 <i>n</i> (ZW ²⁰)=6; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=5	ND	ND	ND
Stage 55 ^{15d}	ND	1.55 <i>P</i> =0.021 <i>n</i> (ZW ²⁰)=4; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=5	1.29 <i>P</i> =0.123 <i>n</i> (ZW ²⁰)=4; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=5	0.91 <i>P</i> =0.515 <i>n</i> (ZW ²⁰)=4; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=4
Stage 55 ^{30d}	ND	1.19 <i>P</i> =0.022 <i>n</i> (ZW ²⁰)=4; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=4	2.15 <i>P</i> =0.003 <i>n</i> (ZW ²⁰)=4; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=4	ND
Stage 56	ND	0.98 <i>P</i> =0.956 <i>n</i> (ZW ²⁰)=6; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=6	1.03 <i>P</i> =0.890 <i>n</i> (ZW ²⁰)=4; <i>n</i> (ZZ ²⁰)=4	ND

(1) SF-1 mRNA/GAPDH mRNA expression ratio measured in ZW²⁰ larvae and divided by those measured in ZZ²⁰ larvae. (2) More details about developmental stages are in Materials and methods. (3) Gonad and mesonephros-interrenal attached (see Materials and methods). (4) Significant values (*P*≤0.05) are in bold face. (5) Not determined. (6) The mean of relative SF-1 mRNA level from each group, *n* (ZW²⁰) and *n* (ZZ²⁰), was compared (Student's *t*-test).

(ZW^{hs}); then, aromatase and SF-1 mRNA levels were measured and compared with those in ZW²⁰ larvae in GMI at stage 55 and in Gd or MI at stage 55^{30d} (Fig. 3). As previously described (Kuntz *et al.* 2003b), aromatase was absent from MI (not shown), and its expression in Gd was insensitive to heat shock when applied after the TSP (Fig. 3A). Conversely, SF-1 mRNA level (Fig. 3B) is slightly reduced under heat shock in GMI at early stage 55 (1.2-fold; *P*=0.355) and in MI at stage 55^{30d} (1.34-fold; *P*=0.127), but not in the isolated Gd at stage 55^{30d}, wherein it appears to be significantly upregulated (1.18-fold; *P*=0.026). This result suggests that *Pleurodeles*

SF-1 is not directly downregulated by temperature. Rather, raising temperature can increase SF-1 mRNA level, at least at stage 55^{30d}, by an unknown tissue-dependent mechanism.

Estrogen sensitivity of SF-1 expression after the end of the TSP

The female-enriched expression of SF-1 occurs after the female-specific increase in aromatase expression. Besides, a decreased SF-1 expression is observed after long-term heat treatment, which is known to

Table 3 ZW³²/ZW²⁰ SF-1 mRNA expression ratio in gonad and/or mesonephros-interrenal and brain

Stage of larval development ⁽²⁾	SF-1 expression in ZW ³² /SF-1 expression in ZW ²⁰ ⁽¹⁾			
	GMI ⁽³⁾	Gonad	Mesonephros-interrenal	Brain
Stage 54	1.33 ⁽⁴⁾ <i>P</i> =0.954 ⁽⁶⁾ <i>n</i> (ZW ³²)=4; <i>n</i> (ZW ²⁰)=5	ND ⁽⁵⁾	ND	0.95 <i>P</i> >0.999 <i>n</i> (ZW ³²)=4; <i>n</i> (ZW ²⁰)=4
Stage 55 ^{15d}	0.61 <i>P</i> =0.008 <i>n</i> (ZW ³²)=4; <i>n</i> (ZW ²⁰)=5	0.27 <i>P</i> =0.001 <i>n</i> (ZW ³²)=3; <i>n</i> (ZW ²⁰)=4	ND	1.08 <i>P</i> >0.999 <i>n</i> (ZW ³²)=4; <i>n</i> (ZW ²⁰)=4
Stage 55 ^{30d}	ND	0.45 <i>P</i> >0.001 <i>n</i> (ZW ³²)=4; <i>n</i> (ZW ²⁰)=4	0.29 <i>P</i> >0.001 <i>n</i> (ZW ³²)=4; <i>n</i> (ZW ²⁰)=4	ND

(1) SF-1 mRNA/GAPDH mRNA expression ratio measured in ZW³² larvae and divided by those measured in ZW²⁰ larvae. (2) More details about developmental stages are in Materials and methods. (3) Gonad and mesonephros-interrenal attached (see Materials and methods). (4) Significant values are in bold face. (5) Not determined. (6) The mean of relative SF-1 mRNA level from each group, *n* (ZW³²) and *n* (ZW²⁰), was compared (ANOVA followed by Bonferroni test).

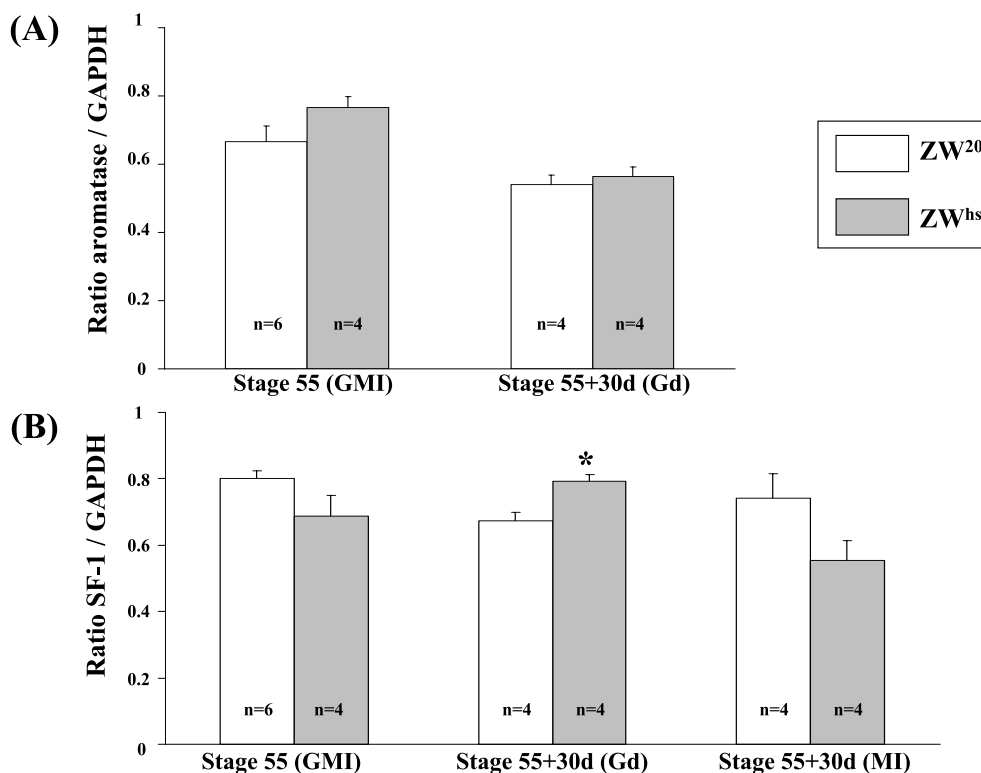


Figure 3 Heat-shock analysis of SF-1 and aromatase mRNA level in gonad (Gd), mesonephros-interrenal (MI) and gonad-mesonephros-interrenal complex (GMI). Expression during early sexual differentiation (stages 55 and 55^{30d}) was measured in ZW²⁰ and compared with those in ZW larvae submitted to a 48-h 32 °C heat shock (ZW^{hs}). Total RNA from a pool of four or five larvae was reversed transcribed and amplified by PCR for 28 cycles. PCR products were agarose gel fractionated, and relative amounts of aromatase (A) and SF-1 (B) mRNAs were normalized to GAPDH mRNA level. Values are means of four or six replicates; the number of pools is indicated by 'n'. Vertical bars indicate the mean standard error. To calculate the *P* value, the mean of relative SF-1 mRNA level from each group, *n* (ZW^{hs}) and *n* (ZW²⁰), was compared (ANOVA followed by the Bonferroni test). **P* < 0.05 vs ZW²⁰.

downregulate aromatase expression in ZW larvae. These results strongly suggest a relationship between estrogens and SF-1 expression in *Pleurodeles*. To test this hypothesis, we performed 48-h estrogen treatments of ZZ larvae (ZZ^{E2}). The mRNA expression of both aromatase and SF-1 was compared with those in ZW²⁰ and ZZ²⁰ larvae in GMI at stage 55 and in Gd or MI at stage 55^{30d} (Fig. 4). We confirmed our previous studies showing the absence of aromatase expression in MI (Kuntz *et al.* 2003b). In Gd, we observed aromatase mRNA expression to be increased in ZZ^{E2} versus ZZ²⁰ larvae (2.1-fold; *P* = 0.003) when estradiol benzoate was applied at stage 55 (Fig. 4A). Such a sensitivity was not observed when the hormonal treatment was performed at stage 55^{30d}. As observed for aromatase, SF-1 mRNA expression is upregulated in GMI (2.4-fold; *P* = 0.002) when estradiol benzoate was applied at stage 55 (Fig. 4B). When the treatment was performed at stage 55^{30d}, such an increase was not observed in Gd,

while a significant difference was still observed in MI between ZZ²⁰ and ZZ^{E2} larvae (1.8-fold; *P* = 0.008). Moreover, in all cases shown in Fig. 4, the SF-1 mRNA level in ZZ^{E2} larvae was not significantly different from that in ZW²⁰ ones. Taken together, these results suggest that mesonephric and/or interrenal SF-1 expression can be increased by circulating estrogens after gonadal differentiation, that is, after the ovarian raise in the level of aromatase expression and activity.

Discussion

Little is known about SF-1 in amphibians, and its involvement in the regulation of steroid hormone synthesis has still to be demonstrated in *P. walli*. Whether SF-1 is involved in the transcriptional regulation of aromatase in *P. walli* is one of the questions we address here. This work was also performed in order to

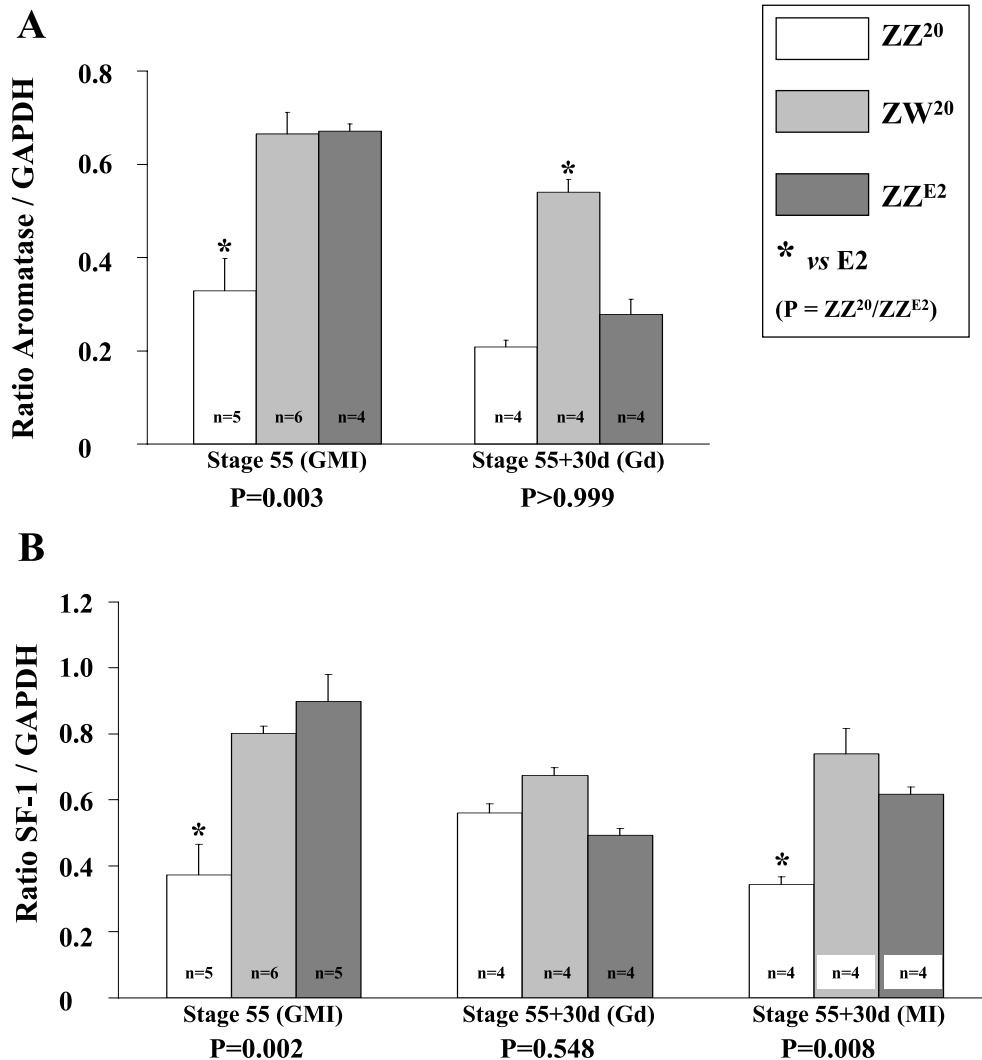


Figure 4 Effect of estradiol benzoate on aromatase and SF-1 mRNA level in gonad (Gd), mesonephros-interrenal (MI) and gonad-mesonephros-interrenal complex (GMI). Total RNA was extracted from ZZ larvae reared in 100 µg/l estradiol benzoate for 48 h (ZZ^{E2}) at stages 55 and 55^{30d}. (A) As a control, aromatase mRNA expression, absent in MI, is shown in GMI and Gd. (B) RT-PCR analysis of SF-1 expression was examined in the conditions described in Fig. 3. Amounts of SF-1 and aromatase mRNAs were normalized to GAPDH mRNA level, and values were analyzed as described in Fig. 3 by comparing the mean of relative mRNA level of the two groups: $n(\text{ZZ}^{20})$ and $n(\text{ZZ}^{\text{E}2})$.

determine whether SF-1 could itself constitute an upstream target of the masculinizing temperature which leads to downregulation of aromatase expression (Kuntz *et al.* 2003b).

We first cloned from adult testis *Pleurodeles* SF-1 cDNA containing an open reading frame that could encode a protein of 468 amino acids. Sequence identity of the deduced protein compared with polypeptides found in other vertebrates showed a high homology, ranging from 81% in *T. scripta* to 63% in man and mouse. As expected, the regions that correspond to known functional domains in the nuclear receptor family

showed higher amino-acid identity than for the protein as a whole. These results suggest that biologic SF-1 function can be conserved in *Pleurodeles* species.

SF-1 was described as a transcription factor expressed in several tissues involved in reproduction and/or steroidogenesis and is currently detected in brain, testis, ovary, and interrenal or adrenal tissue in mouse, chicken, *T. scripta* and frog (Ingraham *et al.* 1994, Kawano *et al.* 1998, Fleming *et al.* 1999, Smith *et al.* 1999, Mayer *et al.* 2002). As in other species, *Pleurodeles* SF-1 transcripts were detected in all adult steroidogenic tissues (Kuntz *et al.* 2004a) as well as in spleen, as

observed in *R. rugosa* (Kawano *et al.* 1998), and, surprisingly, in lung, where aromatase activity is also present (Kuntz *et al.* 2004a). These results suggest a role for SF-1 in the steroid hormone synthesis pathway, as in chicken (Kudo *et al.* 1996), and *Xenopus* (Akatsuka *et al.* 2005) and teleost (Gardner *et al.* 2005) species, where SF-1 consensus binding sites are conserved in aromatase 5'-flanking region. However, *Pleurodeles* SF-1 cis-acting targets in the aromatase gene promoter remain to be discovered.

Then we examined *P. waltil* SF-1 expression during sexual differentiation. Qualitative expression analysis revealed the presence of an SF-1 transcriptional activity as early as stage 42, in ZZ²⁰ and ZW²⁰ or ZW³², and this sex- and temperature-independent signal was observed at all stages of the TSP. This result is consistent with those obtained in mouse, where SF-1 transcripts are present in the undifferentiated urogenital ridge in both sexes before the onset of *Sry* expression (Ikeda *et al.* 1993). Such a gonadal expression pattern, prior to sexual differentiation, is also observed in chicken (Smith *et al.* 1999), turtle (*T. scripta*) (Fleming *et al.* 1999), alligator (Western *et al.* 2000) and frog (*R. catesbeiana*) (Mayer *et al.* 2002). This early presence of SF-1 mRNA in *Pleurodeles* GMI is correlated with its role in the first differentiation steps of the two primary steroidogenic organs: the Gd and interrenal tissue, as demonstrated in other species (Luo *et al.* 1994). Furthermore, gonadal SF-1 expression occurs before expression of its steroidogenic target genes (Parker & Schimmer 2002). However, the question of whether SF-1 is expressed during the TSP in Gd, MI or both in *P. waltil* awaits an answer from *in situ* hybridization studies. Such histologic investigations would also determine whether SF-1 expression and activity are localized in aromatase-producing cells.

After the onset of gonadal sex differentiation, the SF-1 expression pattern becomes sexually dimorphic among species. In mouse embryos, SF-1 expression persists during testicular differentiation, but it declines during ovarian differentiation (Ikeda *et al.* 1994). A similar pattern was found in other mammals (Hatano *et al.* 1994, Pilon *et al.* 1998, Hanley *et al.* 2000) and in turtle (*T. scripta*) (Fleming *et al.* 1999), but not in chicken (Smith *et al.* 1999), alligator (Western *et al.* 2000), frog (*R. catesbeiana*) (Mayer *et al.* 2002) or *P. waltil*. In the last mentioned, our semiquantitative analysis showed a transient increase of the SF-1 transcript level in the ovary after the beginning of its differentiation. This sexually dimorphic expression was detected at stages 55^{15d} and 55^{30d}, which develop after the first evidence of histologic sex differentiation that takes place at stage 53. The female-enriched expression was higher at stage 55^{15d} than at stage 55^{30d}, whereas no significant difference was observed at stage 56. The ovarian specific increase in SF-1 expression could appear as early as stage 55, since a 2-14-fold higher expression was

detected in GMI at this stage. However, since at this stage as well as earlier ones, we could not separate Gd from MI, and since both tissues express SF-1, this hypothesis cannot be validated. Surprisingly, in MI, a similar transient increase in SF-1 expression in ZW²⁰ larvae was observed, but it appeared at stage 55^{30d}, that is, later than in Gd. The delay observed for the maximum SF-1 expression in MI suggests that the SF-1 gene may be more directly activated in Gd, where aromatase is expressed, than in MI, where aromatase is not transcribed. We note that expression of SF-1 in mesonephros or interrenal tissue is very poorly described in the literature; to our knowledge, there are no data about it during the period of sex differentiation. It appears that SF-1 gene transcription can be positively regulated by estrogen in *Pleurodeles*. Indeed, we observed that upregulation of SF-1 mRNA expression can be triggered by exogenous stimulation with estradiol benzoate. In Gd, the local production of these hormones can stimulate SF-1 expression earlier than in MI, which does not produce estrogen and is sensitive to the sole circulating hormones. In *T. scripta*, estrogen was also shown to modulate the regulation of SF-1 transcription, since treatment with estradiol applied at a male-producing temperature resulted in upregulation of gonadal SF-1 and female hatching (Fleming & Crews 2001). However, whether estrogens have a direct or indirect effect on SF-1 expression is not known. Therefore, in *P. waltil*, SF-1 expression could be correlated with the high level of steroidogenic activity necessary to support female sexual development, as in chicken embryos, where the developing ovary displays a higher steroidogenic activity than the testis (Woods & Erton 1978, Guichard *et al.* 1979), while the opposite is observed in mammals (Jost 1970). In *Pleurodeles*, the aromatase and SF-1 expression patterns appear to be closely related, both increasing, during ovarian differentiation, respectively at stages 54 (Kuntz *et al.* 2003b) and 55 (this work). However, SF-1 expression decrease at stage 56 cannot be explained by a reduction in aromatase activity, which is still high at this moment (Chardard & Dournon 1999). Instead, this decrease may be related to the end of the hormone-sensitive period, at which aromatase expression is no longer activated by estradiol.

Whether the SF-1 gene, as a possible regulator of aromatase, is a target of temperature in *Pleurodeles* temperature-dependent sex reversal is another question we address. Our results obtained under heat treatment differ from those obtained in *T. scripta*, in which SF-1 mRNAs increase at male-producing temperature but decline at female-producing temperature (Fleming *et al.* 1999), but are closer to those obtained in *R. rugosa*, in which SF-1 mRNA level remains unchanged in the female-to-male sex reversal, while that of P450 aromatase declines (Kato *et al.* 2004). Indeed, in our

model, we detected a significant decrease in SF-1 expression in Gd of ZW³² larvae at stages 55^{15d} and 55^{30d} with regard to that observed in ZW²⁰ ones. Such a significant decrease is also observed in MI at stage 55^{30d}. According to the results of estrogen treatments, this inhibition of the female-specific peak of SF-1 mRNA in both Gd and MI could be due to the previously described defect in aromatase expression and estrogen synthesis induced under the effect of heat treatment leading to sex reversal (Chardard *et al.* 1995). These results support the hypothesis of a regulation of SF-1 gene expression by estrogen level rather than by a direct effect of temperature. This is strengthened by the fact that, when larvae are submitted to a 48-h heat shock, the SF-1 mRNA response is quite different from that observed after long-term heat treatment, since a weak but not significant inhibition of SF-1 transcription can be observed in MI, while mRNA level is significantly increased in Gd. Since this test was run after TSP, this does not mean that SF-1 could be a target of the masculinizing temperature in the course of sex reversal.

Recently, the brain has been suggested to be involved in sex determination in a turtle exhibiting temperature sex determination (TSD), such as *Malaclemys terrapin*, in which temperature-dependent SF-1 mRNA level rises earlier in female than in male brain before gonadal differentiation (Jeyasuria & Place 1997). In *T. scripta*, the brain also seems to be the site of aromatase response to temperature, since differential aromatase activity was detected in brain during the TSP, whereas no differential activity was observed in Gd (Willingham *et al.* 2000, Crews *et al.* 2001). In *Pleurodeles*, our semiquantitative RT-PCR analysis did not show any differential expression of SF-1 in brain from ZZ²⁰, ZW²⁰ and ZW³² larvae taken at the beginning of sex-specific gonadal differentiation. This result is similar to that observed for aromatase expression (Kuntz *et al.* 2004b), suggesting that brain does not significantly interfere in the sexual determination or differentiation of the Gd in *P. waltli* and would not be considered to play a role in temperature-dependent sex reversal.

This work sheds a new light on the agents involved in *Pleurodeles* gonadal differentiation, although aromatase and estrogen seem to remain, at that time, the most important pieces of the puzzle. However, additional results will be necessary to understand the overall regulation of estrogen synthesis and the actual involvement of SF-1 in the complex path of ovarian differentiation and/or determination.

Acknowledgements

We thank Jean-Charles Olry and Alain Iurétig for animal rearing, and Henri Schroeder for valuable help in statistical analysis of results. The authors declare that

there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Funding

This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer, comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et des Vosges, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Université Henri Poincaré-Nancy 1 (BQR), and the Conseil Régional de Lorraine. S K is a recipient of a grant from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC & Jameson JL 1999 A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex-reversal and adrenal failure in humans. *Nature Genetics* **22** 125–126.
- Akatsuka N, Komatsuzaki E, Ishikawa A, Suzuki I, Yamane N & Miyata S 2005 Expression of the gonadal p450 aromatase gene of *Xenopus* and characterization of the 5'-flanking region of the aromatase gene. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **94** (Epub).
- Chardard D & Dournon C 1999 Sex-reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltli*. *Journal of Experimental Zoology* **283** 43–50.
- Chardard D, Desvages G, Pieau C & Dournon C 1995 Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltli* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex-reversal by thermal treatment effect. *General and Comparative Endocrinology* **99** 100–107.
- Crews D, Fleming A, Willingham E, Baldwin R & Skipper JK 2001 Role of steroidogenic factor 1 and aromatase in temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle. *Journal of Experimental Zoology* **290** 597–606.
- Dournon C & Houillon C 1984 Genetic demonstration of functional sex inversion in *Pleurodeles waltlii* Michah (Urodele Amphibian) under the effect of temperature. *Reproduction, Nutrition, Development* **24** 361–378.
- Fleming A & Crews D 2001 Estradiol and incubation temperature modulate regulation of steroidogenic factor 1 in the developing gonad of the red-eared slider turtle. *Endocrinology* **142** 1403–1411.
- Fleming A, Wibbels T, Skipper JK & Crews D 1999 Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology* **116** 336–346.
- Gallien L 1951 Unisexual progeny of a female *Pleurodeles Waltlii* Michah, subjected, during the larval stage, to the gynogenic effect of estradiol benzoate. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* **233** 828–830.
- Gallien L & Durocher M 1957 Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltli*. *Bulletin Biologique France et Belgique* **91** 97–114.
- Gardner L, Anderson T, Place AR, Dixon B & Elizur A 2005 Sex change strategy and the aromatase genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **94** 395–404.
- Guichard A, Cedard L, Mignot TM, Scheib D & Haffén K 1979 Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroid precursors. *General and Comparative Endocrinology* **39** 9–19.

- Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H & Wilson DI 2000 SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of Development* **91** 403–407.
- Hatano O, Takayama K, Imai T, Waterman MR, Takakusu A, Omura T & Morohashi K 1994 Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4 BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* **120** 2787–2797.
- Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP & Parker KL 1993 Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Molecular Endocrinology* **7** 852–860.
- Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA & Parker KL 1994 Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology* **8** 654–662.
- Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH & Parker KL 1995 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Molecular Endocrinology* **9** 478–486.
- Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH & Parker KL 1994 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes and Development* **8** 2302–2312.
- Jayasuria P & Place AR 1997 Temperature-dependent aromatase expression in developing diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) embryos. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **61** 415–425.
- Jost A 1970 Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **259** 119–130.
- Kato T, Matsui K, Takase M, Kobayashi M & Nakamura M 2004 Expression of P450 aromatase protein in developing and in sex-reversed gonads of the XX/XY type of the frog *Rana rugosa*. *General and Comparative Endocrinology* **137** 227–236.
- Kawano K, Miura I, Morohashi K, Takase M & Nakamura M 1998 Molecular cloning and expression of the SF-1/Ad4 BP gene in the frog, *Rana rugosa*. *Gene* **222** 169–176.
- Kudo T, Yamamoto H, Sato S & Sutou S 1996 Comparison of 5' upstream regions of chicken and quail aromatase genes. *Reproduction and Development* **42** 101–107.
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I & Flament S 2003a Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenetics and Genome Research* **101** 283–288.
- Kuntz S, Chesnel A, Duterque-Coquillaud M, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Dournon C, Flament S & Chardard D 2003b Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex-reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **84** 89–100.
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Ducatez M, Callier M & Flament S 2004a Expression of aromatase and steroidogenic factor 1 in the lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology* **145** 3111–3114.
- Kuntz S, Chesnel A, Flament S & Chardard D 2004b Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltl*. *Journal of Molecular Endocrinology* **33** 717–727.
- Lala DS, Rice DA & Parker KL 1992 Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Molecular Endocrinology* **6** 1249–1258.
- 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.
- Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL & White BA 1993 Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Molecular Endocrinology* **7** 776–786.
- Mayer LP, Overstreet SL, Dyer CA & Propper CR 2002 Sexually dimorphic expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) in developing gonads of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *General and Comparative Endocrinology* **127** 40–47.
- Michael MD, Kilgore MW, Morohashi K & Simpson ER 1995 Ad4 BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. *Journal of Biological Chemistry* **270** 13561–13566.
- Parker KL & Schimmer BP 2002 Genes essential for early events in gonadal development. *Annals of Medicine* **34** 171–178.
- Pilon N, Behdjani R, Daneau I, Lussier JG & Silversides DW 1998 Porcine steroidogenic factor-1 gene (pSF-1) expression and analysis of embryonic pig gonads during sexual differentiation. *Endocrinology* **139** 3803–3812.
- Schnabel CA, Selleri L & Cleary ML 2003 Pbx1 is essential for adrenal development and urogenital differentiation. *Genesis* **37** 123–130.
- Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, Sasaki H, Osawa Y, Ninomiya Y & Niwa O 1995 Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Developmental Dynamics* **204** 22–29.
- Smith CA, Smith MJ & Sinclair AH 1999 Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology* **113** 187–196.
- Tanaka M, Fukada S, Matsuyama M & Nagahama Y 1995 Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **117** 719–725.
- Tong SK & Chung BC 2003 Analysis of zebrafish cyp19 promoters. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **86** 381–386.
- Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G & Martinez A 2003 SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nuclear Receptor* **1** 8–31.
- Western PS, Harry JL, Marshall Graves JA & Sinclair AH 2000 Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* **241** 223–232.
- Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA & Haussler MR 1999 Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement* **32–33** 110–122.
- Wibbels T, Cowan J & LeBoeuf R 1998 Temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Zoology* **281** 409–416.
- Willingham E, Baldwin R, Skipper JK & Crews D 2000 Aromatase activity during embryogenesis in the brain and adrenal-kidney-gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology* **119** 202–207.
- Woods JE & Erton LH 1978 The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *General and Comparative Endocrinology* **36** 360–370.
- Yoshiura Y, Senthilkumaran B, Watanabe M, Oba Y, Kobayashi T & Nagahama Y 2003 Synergistic expression of Ad4 BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. *Biology of Reproduction* **68** 1545–1553.
- Zaborski P 1986 Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and H-Y antigen expression in gonads of a newt. *Progress in Clinical and Biological Research* **217A** 163–169.

Received in final form 14 October 2005

Accepted 31 October 2005

Made available online as an Accepted preprint on 22 November 2005

Annexe 2

Freemartin in the Amphibian *Pleurodeles waltl*: Parabiosis Between Individuals From Opposite Sex Triggers Both Germ and Somatic Cells Alterations During Female Gonad Development

HELENE DUMOND,¹ JEAN-PIERRE MAUFROID,² CHIA-I KO,¹ DOMINIQUE CHARDARD,¹ AMAND CHESNEL,¹ AND STEPHANE FLAMENT^{1*}

¹EA 3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Nancy-Université, Nancy, France

²EA1033 Laboratoire de biologie du développement, Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

ABSTRACT Wild type embryos of the newt *Pleurodeles waltl* were used to realize parabiosis, a useful model to study the effect of endogenous circulating hormones on gonad development. The genotypic sex of each parabiont (ZZ male or ZW female) was determined early from the analysis of the sex chromosome borne marker peptidase-1. In ZZ/ZZ and ZW/ZW associations, gonads develop according to genetic sex. In ZZ/ZW associations, the ZZ gonads differentiate as normal testes while ZW gonads development shows numerous alterations. At the beginning of sex differentiation, these ZW gonads possess a reduced number of germ cells and a reduced expression of steroidogenic factor 1 and P450-aromatase mRNAs when compared to gonads from ZW/ZW associations. During gonad differentiation, conversely to the control situation, these germ cells do not enter meiosis as corroborated by chromatin status and absence of the meiosis entry marker DMC1; the activity of the estradiol-producing enzyme P450-aromatase is as low as in ZZ gonads. At adulthood, no germ cells are observed on histological sections, consistently with the absence of VASA expression. At this stage, the testis-specific marker DMRT1 is expressed only in ZZ gonads, suggesting that the somatic compartment of the ZW gonad is not masculinized. So, when exposed to ZZ hormones, ZW gonads reach the undifferentiated status but the ovary differentiation does not occur. This gonad is inhibited by a process affecting both somatic and germ cells. Additionally, the ZW gonad inhibition does not occur in the case of an exogenous estradiol treatment of larvae. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 439–449, 2008.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key Words: sex differentiation; ovary; testis; steroid hormones; meiosis entry

INTRODUCTION

The newt *Pleurodeles waltl* is a urodele amphibian exhibiting female heterogamety: females possess ZW

chromosomes whereas males have ZZ chromosomes. Sex chromosomes cannot be distinguished by conventional karyotypes but the genotype can be deduced from the analysis of a sex-linked marker, peptidase-1. Interestingly, genetic sex determination can be modified by environmental conditions, namely temperature of the rearing water: when temperature is maintained at 32°C during the temperature-sensitive period (stages 42–54), 100% of ZW larvae differentiate as phenotypic fertile males (Dournon and Houillon, 1985).

The gonads originate from an out-pocket of cells on the ventral area of the mesonephros. Migrating germ cells colonize the somatopleure leading to the formation of a genital ridge. The gonads develop due to the proliferation of both somatic and germ cells. After this indifferent stage, ovarian differentiation in ZW larvae is characterized by the development of the cortical part which includes large follicles while medulla regression leaves a cavity. In contrast, testis differentiation results from a strong development of the medulla and a simultaneous cortical regression. In *Pleurodeles*, stage 53 is the first stage at which the sex of the gonad may be ascertained by histological examination. When compared to other vertebrates, gonad differentiation is a slow process in *Pleurodeles* and in other amphibians as well: it occurs only during larval life and in some cases (undifferentiated and semi-differentiated species) it takes place around and even after metamorphosis (Dournon et al., 1990; Hayes, 1998).

Grant sponsor: Ligue Contre le Cancer (Comités de la Meurthe et Moselle et de la Meuse); Grant sponsor: Association pour la Recherche sur le Cancer; Grant sponsor: Conseil Régional de Lorraine; Grant Sponsor: Université Henri Poincaré.

*Correspondence to: Stephane Flament, Nancy-Université, Faculté des Sciences, EA3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France.
E-mail: stephane.flament@sbiol.uhp-nancy.fr

Received 17 November 2006; Accepted 1 March 2007
Published online 15 November 2007 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com).
DOI 10.1002/mrd.20750

As observed in other non-mammalian vertebrates, steroid hormones play a key role in *P. waltl* sex differentiation (Kuntz et al., 2003a). In this context, aromatase, the enzyme responsible for estrogen synthesis, is a major player: measurements of its activity in gonad-mesonephros complexes (GM) reveals a higher activity in ZW larvae than in their ZZ counterparts (Chardard et al., 1995) and treatment of ZW larvae with an aromatase inhibitor induces sex reversal (Chardard and Dournon, 1999). The role of steroids in sex differentiation is also evidenced by the fact that when added to the rearing water of ZZ larvae from stage 50 until metamorphosis, estradiol induces male to female sex reversal whereas the non-aromatizable androgen dihydrotestosterone drives ZW larvae to differentiate as males (Kuntz et al., 2003b). Although these experimental data clearly demonstrate the effect of exogenous steroids on gonad differentiation, we have a poor knowledge not only of the natural steroids produced by *Pleurodeles* larvae during the period of development where sex differentiation takes place, but also of their concentrations as well as of the kinetics of their synthesis.

In order to experimentally study the effects that hormones from one sex can exert on the other, some authors have performed male/female combinations in several amphibian species. The first experiments have been performed on the urodele *Ambystoma tigrinum* that was used for parabiosis, a method by which two embryos are surgically associated and then develop together with a connection between their circulating system (Burns, 1925). In *P. waltl*, other kinds of association have been obtained either by grafts of the abdominal half of a donor embryo onto the flank of a receptor embryo of the other sex or by chimera with abdomen in duplicate (Collenot et al., 1987). In these cases, the development of the female gonads is modified: they develop into thin and narrow bands where germ cells are rare or absent, the ovarian cavity remains virtual and collagenous fibers appear between cortex and medulla. Their transformation into testes is exceptional and when it happens, it is very restricted along the gonadal strand. This is not observed when similar experiments are performed in other urodele amphibian species such as *Triturus* and *Ambystoma* where the testis exerts a strong masculinizing effect on the female gonad which differentiates either into an ovotestis or a small testis (Gallien, 1973). In anuran amphibians, the masculinizing effect of the male gonad is lower and sometimes absent (Huchon, 1971). In *P. waltl*, it is to notice that in most cases, experiments have been performed with embryos from all male and all female progenies which are the results of matings between standard and sex-reversed animals (ZZ male \times ZZ female treated with estradiol and ZZ male \times WW female, respectively). When embryos from two progenies are needed, timing problems may occur since the two females do not always produce their eggs simultaneously.

In the present work, we used wild type individuals for parabiosis studies since this material is easier to obtain

than simultaneous all male and all female progenies. We took advantage from the sex-linked marker peptidase-1 analysis to identify the sex of each parabiont before gonad differentiation.

A histological study allowed us to confirm that ZW gonad development is affected in case of ZZ/ZW associations. This analysis was completed by the evaluation of germ cell number, by the study of meiosis entry and gonad somatic cell differentiation by use of several molecular markers cloned in our laboratory: VASA and DMC1 (germ cell markers) and SF1, P450-aromatase, DMRT1 genes (gonad somatic cell markers). P450-aromatase activity was also measured. Our results show that in ZZ/ZW associations, ZW germ cells development is inhibited both quantitatively and qualitatively, especially in regard to meiosis entry. Somatic cells of this gonad remain undifferentiated. Moreover, we show that treatment of ZZ/ZW parabioses with estradiol before gonadal differentiation is able to counteract the ZW gonad inhibition.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Matings were performed between ZZ males and ZW females. Sex ratios of the progenies were always approximately (1:1). Embryos and larvae were staged according to the developmental stages described by Gallien and Durocher (1957) (Fig. 1A). When they reached the tailbud stage (stage 22), embryos were manually dejellied and their vitelline membrane was removed using fine forceps in order to prepare them for parabiosis (Fig. 1B). A shallow groove large enough to accommodate two embryos side-by-side was made in the modeling clay of an operating dish. In the same dish filled up with Holtfreter's medium (35 g/L NaCl, 0.1 g/L CaCl₂, 0.05 g/L KCl, Tris-HCl 560 mg/L pH 7.4), an area of ectoderm and subjacent mesoderm just posterior to the gill bulge was removed from both embryos. These embryos were placed in the groove, ventral side up, and gently pressed together with modeling clay during several hours. This allowed the healing of tissues. Due to the sex ratio (1:1) and to the unknown genotype at this early stage, associations were randomly performed between ZZ/ZW embryos (50% of the parabioses), ZZ/ZZ (25%) and ZW/ZW (25%). Animals were then reared at ambient temperature (20 \pm 2°C) in Holtfreter 1/10 and then in tap water. During larval life, parabioses were harvested and analyzed at stage 53, 54, 54 + 2 months and 54 + 3 months at which metamorphosis takes place. Eighteen months old adults were also studied. The local Animal Care and Use Committee approved the experimental protocols, and guidelines for laboratory procedures were followed at all times.

In all figures, a legend as "ZZ/(ZW)" means that in such an association, only the data of the ZZ individual is shown. "Homosex" associations are either ZZ/ZZ or ZW/ZW ones and "heterosex" associations are ZZ/ZW ones.

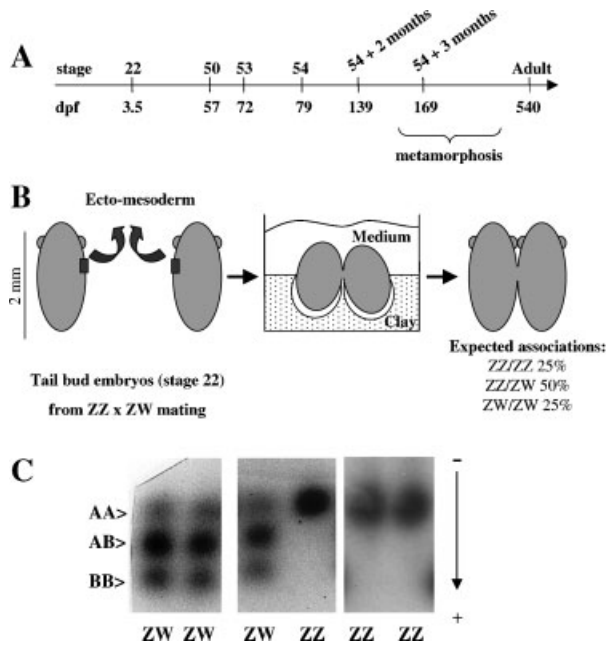


Fig. 1. **A:** Summarized table of development of *Pleurodeles waltl*. The stages that were studied and the corresponding days post-fertilization (dpf) are shown. **B:** Surgical protocol for parabiosis. The experiment is performed between individuals from a standard progeny whose genotype cannot be determined at this stage and results in ZZ/ZZ, ZW/ZW and ZZ/ZW associations whose statistically deduced ratios are indicated. After ecto-mesoderm removal (left panel dorsal view), the two embryos are gently pressed together with modeling clay during several hours to allow the healing of tissues (right panel cross-section). **C:** Analysis of the sexual genotype of parabiotically associated animals. Example of three parabioses analyzed at stage 50. In ZW individuals, peptidase-1 appears as three spots on the gel (homodimers AA and BB, and the heterodimer AB). In ZZ larvae, only one spot is detected (homodimer AA).

Determination of Sexual Genotype and Phenotype

For sexual genotype analysis, at stage 50, the extremity of the tail was removed from animals anaesthetized with 0.03% benzocaine, and homogenized in 50 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM NaCl buffer. Samples were electrophoresed in a 9% stacking-12% running starch horizontal gel. The patterns of peptidase-1 were revealed by specific hydrolysis of valyl-leucine substrate coupled with peroxydase colored reaction as previously described (Dournon et al., 1988). The ratios obtained were roughly 25% ZZ/ZZ, 25% ZW/ZW and 50% ZZ/ZW as expected (Fig. 1B).

At later stages of development, these parabionts were anaesthetized, their gonads were subjected to a morphological examination and then fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin and sectioned at 7 μ m. Sections were stained with hematoxylin-eosin-light green. The sexual phenotype was compared to the genotype. Germ cells number per gonad was calculated by examination of all the sections of each gonad. We determined that one germ cell was present on three adjacent sections and consequently the total number of

counted germ cells was divided by three to obtain the number of germ cells per gonad. In addition, some morphometric parameters were measured on the nucleus of germ cells at several stages by the use of the LuciaG software 4.81 for image analysis (Laboratory imaging). These parameters were the perimeter and the circularity index ($4\pi \text{ area/perimeter}^2$). When circularity index = 1, nuclei are perfectly round.

RT-PCR Analyses

The detailed protocol for reverse transcription has been described previously (Kuntz et al., 2003b). Total RNA was extracted from pools of three gonad-mesonephros complexes (GM) at stages 53, 54 or 54 + 2 months or from 20 to 50 mg of adult tissues using 200 μ l of TRIzol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and quantified. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed using hexamer primers and 100 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 25 μ L. A 2 μ L aliquot of resultant cDNA was used for PCR.

The amplification was performed with 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl₂ and 10 pmol of each primer in a total volume of 25 μ L. Specific primers and conditions of amplification for GAPDH, P450-aromatase and SF1 cDNAs have been described previously (Kuntz et al., 2003b). Those for VASA, DMRT1 and DMC1 are indicated in Table 1. PCR products (12 μ L) were run in a 1% agarose gel containing 0.5 mg/L ethidium bromide.

Quantitative real-time PCR analysis was performed on a MiniOpticon System (Biorad) by using SYBR-green labeling. Each RNA sample was analyzed in triplicate with specific VASA, DMC1 or GAPDH primers (Table 1). DMC1 expression was normalized to VASA transcript expression as germ cells control and compared in heterosex or homosex associations.

P450-Aromatase Activity Measurement

The activity of the enzyme was determined by the use of the tritiated water method as previously described (Chardard et al., 1995). The radioactivity from tritiated water released by aromatization of [1β -³H] androstenedione was measured and enzymatic activity calculated and expressed in femtomoles of estrone produced per GM per hour.

Statistical Analysis

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

TABLE 1. Primers Used for PCR Analyses

Gene accession no.	Primers	T _m (°C) MgCl ₂ (mM)	Cycle number	Fragment length (bp)
DMRT1 (DQ265802)	dir 5'-agcctgatcggcagcgcagc-3' rev 5'-cactgccacctggactgctg-3'	62 2.0	28	393
VASA (DQ265800)	dir 5'-ctggaattaatttcgataaatatg-3' rev 5'-gcagccttgatatactggcgc-3'	56 1.5	35	447
VASA (real-time PCR)	dir 5'-tgtgtgcaactccaggaaga-3' rev 5'-tcaggaccaaagcccatatc-3'	58.7		166
DMC1 (DQ265801)	dir 5'-gcagtctcatacactgtgcttac-3' rev 5'-cacagctacgttgactcttcagag-3'	60 2.5	30	391
DMC1 (real-time PCR)	dir 5'-gaccgctacgagatattgc-3' rev 5'-tttgagcaacgtagtcgag-3'	54.4		124
GAPDH (real-time PCR)	dir 5'-gaccgctacgagatattgc-3' rev 5'-cacagcatgtacagtggctatca-3'	65		111

RESULTS

Genotype of Parabionts Can be Deduced From Peptidase-1 Analysis

Parabiosis experiments have often been performed on all-male and all-female populations of *P. waltl* embryos but the high synchronism required between the two layings constitutes a major disadvantage of this material. Therefore, in the current study, parabioses were performed randomly between tailbud embryos (stage 22) from wild type progenies. Parabiont pairs were grown up to stage 50 at which genetic sex was checked by peptidase-1 analysis. Since this enzyme displays an ubiquitous expression pattern including blood cells which are exchanged in associated animals, we attempted to determine if in such parabiont pairs, the genotype of each individual could be deduced from this analysis. This dimeric and polymorphic enzyme is encoded by two codominant genes: pep1A on chromosome Z and pep1B on chromosome W (Ferrier et al., 1980). Thus, in ZW larvae the analysis of the electrophoretic pattern of peptidase-1 reveals three spots (either AA, AB or BB dimers) whereas only one spot is detected in ZZ individuals (AA isoform). Starch gel analysis of parabioses shows an identical peptidase-1 pattern in both partners of ZZ/ZZ and ZW/ZW associations whereas two different patterns appear in the case of ZZ/ZW ones (Fig. 1C). As expected (Fig. 1B), the latter situation was the most frequently observed.

Inhibition of ZW Gonad Differentiation in ZZ/ZW Associations

Parabioses were grown in order to confirm the effect of the ZZ gonad on the ZW one and to get new informations on this process. Between stage 53 and stage 54 + 2 months, the normal process of gonadal differentiation was observed both in ZZ/ZZ and ZW/ZW pairs (Fig. 2). The differentiating testis showed germ cells in the medulla whereas in the differentiating ovary, germ cells were localized in the cortex and a central cavity could be observed at stage 54 + 2 months. At this stage, some germ cells had entered meiosis only in the ZW/ZW gonads since two germ cell phenotypes could be observed. The first one was characterized by a large

nuclear perimeter ($124 \pm 20 \mu\text{m}$, $n = 12$) and a low nuclear circularity index (0.5 ± 0.1 , $n = 12$) and looked like germ cells from the other parabionts. The second one was observed only in ZW/ZW gonads: the nucleus displayed a lower perimeter ($75 \pm 9 \mu\text{m}$, $n = 12$) and a higher circularity index (0.93 ± 0.06 , $n = 12$). The condensed chromatin of these nuclei indicated meiosis entry. In ZZ/ZW associations, the ZZ gonad seemed to differentiate as a testis but the localization of the germ cells in the medulla was only clearly observed at stage 54 + 2 months, that is later than in ZZ/ZZ parabionts. In the ZW gonad of the heterosex associations, the usual central cavity did not appear and germ cells remained located in the cortex. These cells appeared as a unique population displaying a polylobular nucleus (circularity index = 0.59 ± 0.1 , $n = 12$) and a chromosomal status that did not suggest meiosis entry, as observed in ZZ gonads.

In order to get more information about germline during this period, germ cells were also counted. At stage 53, there was no difference in germ cell numbers between the different kinds of association (Fig. 3). At stage 54, germ cells were more numerous in gonads of ZW/ZW pairs than in gonads of ZZ/ZZ pairs (379 ± 54 , $n = 4$ vs. 118 ± 17 , $n = 4$). In case of ZZ/ZW associations, intermediate values were observed in both ZZ and ZW gonads (174 ± 27 , $n = 6$ and 238 ± 24 , $n = 4$, respectively). At stage 54 + 2 months, germ cells had proliferated in gonads of ZW/ZW pairs (547 ± 109 , $n = 4$) whereas a lower number was counted in all the other types of gonads (205 ± 48 , $n = 4$ in ZZ/ZZ; 241 ± 36 , $n = 3$ in ZZ/(ZW); 231 ± 41 , $n = 3$ in ZW/(ZZ)). So, up to stage 54 + 2 months, germline from ZW/(ZZ) gonads did not proliferate as much as in ZW/ZW ones.

At stage 54 + 3 months, i.e. during metamorphosis, the normal status of the gonads in both ZZ/ZZ and ZW/ZW associations could be observed by a simple macroscopical examination (Fig. 4). The testis began to increase in volume in its posterior part which will give the first lobe of the testis at adult stage. Cysts with germ cells were present on histological sections. The ovary looked like a flattened narrow band along the antero-posterior axis. Growing oocytes arrested in prophase I (nuclear perimeter = $292 \pm 72 \mu\text{m}$, $n = 9$;

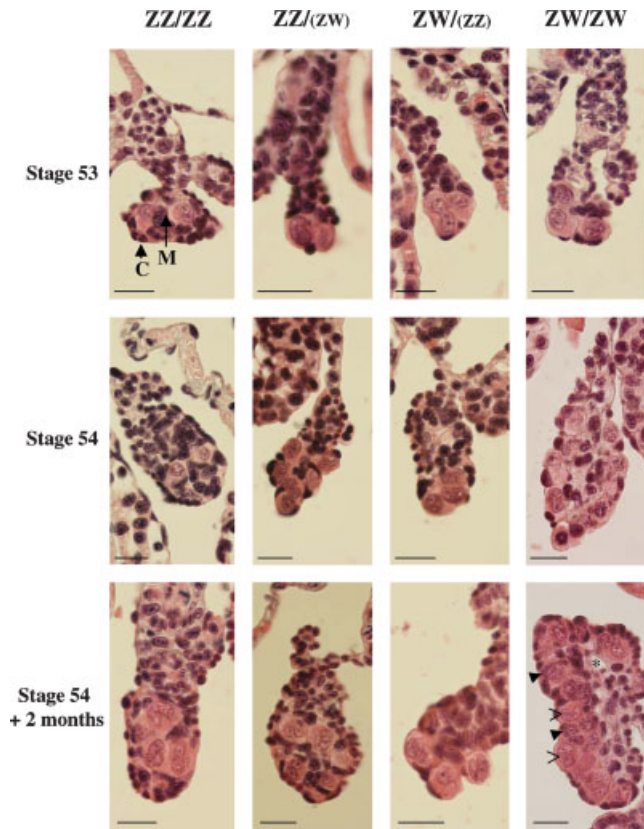


Fig. 2. Histology of gonads in parabiotic animals from stage 53 to 54 + 2 months. In ZZ/ZZ parabioses, the differentiating testis is recognized by the localization of germ cells in the medulla of the gonad as soon as stage 53. In ZZ/ZW associations, the ZZ gonad differentiates as a testis but the medullar localization of the germ cells appears later at stage 54 + 2 months (see ZZ/(ZW)). In ZW/ZW parabioses, the differentiated ovary is characterized by germ cells in the cortex of the gonad and degeneration of the medulla that leaves a central cavity (*). The latter is clearly observed at stage 54 + 2 months and at this stage, germ cells seem to have proliferated (mitotic figures can be observed in ZW/ZW gonads at stage 54). Open arrows indicate a germ cell with polylobular nucleus whereas plain arrows show a germ cell with condensed chromosomes in the nucleus. In ZZ/ZW associations, the ZW parabiont has abnormal gonads (see ZW/(ZZ)): at stage 54 + 2 months, there is no central cavity, germ cells are in a cortical position, their number is not as high as in a typical ovary and they have not entered meiosis. Bars = 25 μ m. C: cortex, M: medulla.

nuclear circularity index = 0.96 ± 0.01 , $n = 9$) with follicular cells were found in the wall around the ovarian cavity. In ZZ/ZW parabioses, the ZZ gonad was clearly a testis. Conversely, the ZW gonad was atypical since its morphology indicated neither a testis nor an ovary. The histology revealed gonads without the usual ovarian cavity, the medulla was made up of numerous somatic cells and germ cells were observed only at the periphery of the organ (Fig. 4). Germ cells number did not increase, their nucleus remained polylobular (circularity index = 0.6 ± 0.1 , $n = 9$) and the chromosomal status still suggested no meiosis entry.

In adults, these atypical gonads did not differentiate into testes or ovaries. They still appeared under their undifferentiated aspect at the morphological examina-

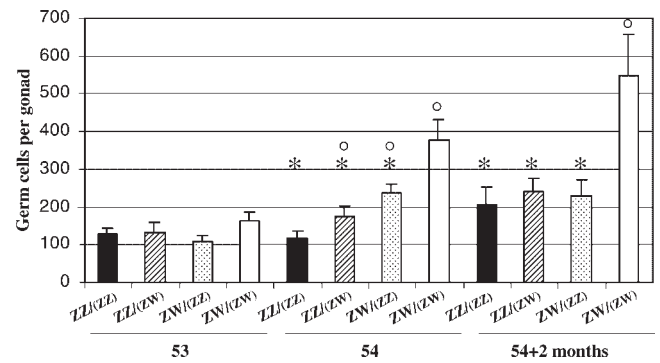


Fig. 3. Germ cells numbers in ZZ or ZW gonads from either homo- or heterosex associations at stages 53, 54, 54 + 2 months. Germ cells number per gonad was calculated by examination of all the sections of each gonad. We determined that one germ cell was present on three adjacent sections and consequently the total number of counted germ cells was divided by three to obtain the number of germ cells per gonad. Vertical bars indicate the standard error of the mean. *Significantly different from ZW/ZW ($P < 0.05$). \circ Significantly different from ZZ/ZZ ($P < 0.05$).

tion but histology revealed a more abnormal structure with many fibrous material, mainly somatic cells and apparently no germ cells (Fig. 4). So, by using sexed wild type animals, we show that the inhibition of ZW gonads differentiation in ZZ/ZW associations is characterized by somatic and germinal compartment alterations that begin as early as stage 54.

Meiosis Entry Impairment in the Inhibited ZW Gonad

In an attempt to better understand the molecular mechanisms underlying the disappearance of germ cells in the inhibited ZW gonad, the expression of germ cell markers was measured in ZZ or ZW gonads of either homosex (ZZ/ZZ or ZW/ZW) or heterosex (ZZ/ZW) associations. The presence of germ cells was deduced from the expression of *P. waltl* VASA homologue (Genbank accession number DQ265800), a gene encoding a germ cell specific DEAD-box RNA-helicase, highly conserved in vertebrates and invertebrates (Parvinen, 2005). Moreover, meiosis entry of germ cells was revealed by expression of *P. waltl* DMC1 homologue (Genbank Acc. number DQ265801), which encodes a RecA-like protein in the synaptonemal complex (Shinohara and Shinohara, 2004).

Expression of both genes was first assessed at larval and adult stages by qualitative RT-PCR (Fig. 5A and B). Before metamorphosis (stages 53 and 54), VASA mRNA was expressed in ZZ and ZW gonads from all types of parabiosis. At adulthood, no transcript was detected in the inhibited ZW gonad whereas gonads from ZW/ZW associations as well as ZZ gonads from ZZ/ZZ or ZZ/ZW associations showed a high level of VASA mRNA expression. The analysis of VASA expression by real-time PCR performed on ZW samples from both types of parabionts confirmed the absence of germ cells in ZW gonads of heterosex associations (Fig. 5C). This is in agreement with the fact that no germ cells could be

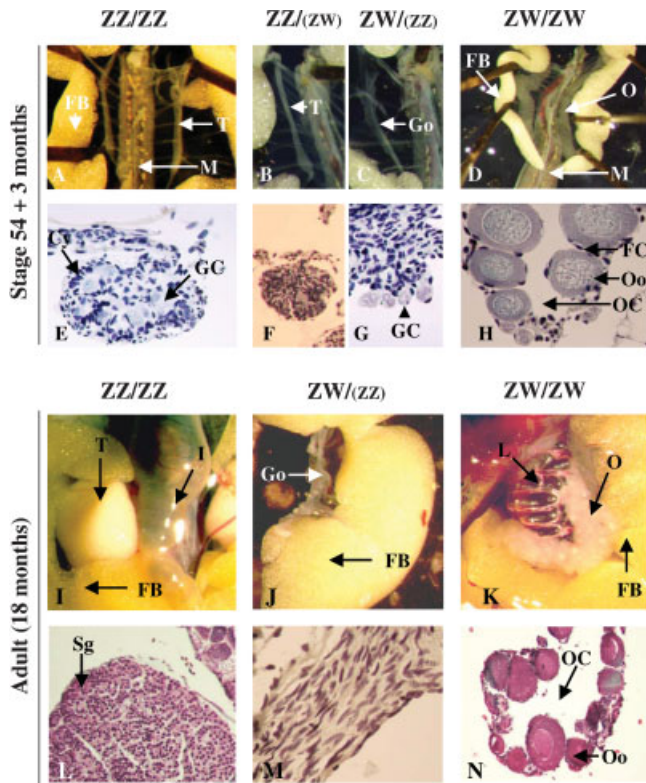


Fig. 4. Morphology and histology of gonads in parabiotic animals at stage 54 + 3 months and at adulthood (18 months). At both stages, the dissected gonads have been subjected to morphological examination (A–D, $\times 7.25$; I–K, $\times 3$) and then to a histological study (E–H $\times 15$, L and N $\times 4$, M $\times 20$). At stage 54 + 3 months, in ZZ/ZW parabioses, the ZZ individual shows typical testes (compare A and B) whose posterior part is swollen. This constitutes in young adults the first lobe of the testis where spermatogenesis occurs (I and L). In contrast, the ZW parabiont from heterosex associations has abnormal gonads (C, G, J, M) that are neither ovaries (D, H, K, N) nor testes (A, E, I, L). At stage 54 + 3 months, the organ is not a flattened narrow band like in ZW controls (compare C and D): it is rather thin but the posterior part does not indicate a testis (compare B and C). The abnormal status of these organs is confirmed at the histological level: they contain numerous somatic cells with germ cells at the periphery (G), easily recognized due to their large size and their polylobular nucleus. In adults, this gonad is vestigial (compare J with I and K) and on histological sections, germ cells seem to have disappeared (M). Cy: cyst, FB: fat body, GC: germ cells, Go: gonad, I: intestine, L: lung, M: mesonephros, O: ovary, OC: ovarian cavity, Oo: oocyte, T: testis.

identified on histological sections from the corresponding vestigial ZW adult gonad (see Fig. 4M).

The earliest expression of DMC1 mRNA was detected at stage 54 + 2 months in ZW gonads of ZW/ZW parabioses whereas no signal was detected in ZW gonads of ZZ/ZW associations at this stage either by qualitative or real-time PCR (Fig. 5A and C). DMC1 transcript is expressed later (2 months after metamorphosis) in ZZ gonads (data not shown). Therefore, in the ZW parabiont associated with a ZZ one, germ cell alteration is not only quantitative but also qualitative since meiosis entry seems to be inhibited. In 18-month-old adults, only ZZ gonads from either ZZ/ZZ or ZZ/ZW parabioses express DMC1 mRNA (Fig. 5B). In fact,

gonad from non parabiont ZW animal also show no DMC1 expression at this stage (data not shown).

Undifferentiated Status of Somatic Cells in the Inhibited ZW Gonad

A semi-quantitative RT-PCR study was performed on P450-aromatase and SF1, two genes expressed in gonad somatic cells whose expressions have been previously described to be higher in normal ZW versus ZZ gonads at stage 54 (Kuntz et al., 2003b, 2006). The same results were observed in homosex parabiont pairs since at stage 54, P450-aromatase mRNA expression was five-fold higher in ZW gonads than in ZZ ones while SF1 expression was only 1.5-fold higher (Fig. 6A). In ZZ/ZW associations, both ZZ and ZW gonads showed intermediate levels of P450-aromatase and SF1 mRNAs. Besides, P450-aromatase activity was measured in each type of parabiont at the same stage 54 (Fig. 6B). As previously described in individual larvae (Chardard et al., 1995), aromatase activity was higher in ZW GM from ZW/ZW parabioses than in ZZ GM from ZZ/ZZ associations (18.4 ± 2.9 vs. 3.6 ± 1.2 femtomoles/GM/hr). However, intermediate levels were measured in GM of both partners in ZZ/ZW associations (11.2 ± 2.4 and 12.8 ± 2.7 femtomoles/GM/hr in ZZ and ZW individuals, respectively). This confirmed the results obtained by RT-PCR. At a later stage, 54 + 3 months, aromatase activity was more than 80-fold higher in ZW GM from ZW/ZW parabioses than in ZZ GM from ZZ/ZZ associations (Fig. 6C). Interestingly, in case of ZZ/ZW associations, aromatase activity in ZW GM was as low as usually measured in ZZ ones.

For a better understanding of whether the low level of aromatase activity was related to a sex reversal mechanism affecting these ZW somatic cells, we checked the expression of *P. waltl* DMRT1 homologue (Genbank accession number DQ265802). The DMRT1 gene, encoding a DM-domain protein, was demonstrated to be involved in human testis differentiation, to have a gonad-specific and sexually dimorphic expression profile during embryogenesis in birds, reptiles and mammals (Smith et al., 1999). In adult *P. waltl* parabionts, DMRT1 mRNA is highly expressed in ZZ but not in ZW gonads whatever the partner (Fig. 7).

Estradiol Treatment Counteracts ZW Gonad Inhibition

In order to determine the influence that estradiol treatment could exert on ZW gonad development in ZZ/ZW associations, peptidase-1 analysis was performed to isolate ZZ/ZW associations at stage 50 and then, E₂ was added to the rearing water (100 μ g/L). This concentration was chosen since it is an efficient dose that enhances male to female sex reversal when used on ZZ animals during the hormone-sensitive period (from stage 51 to metamorphosis) (Chardard et al., 2003). At stage 54 + 3 months, the parabionts were anaesthetized and their gonads were dissected. The morphology of the gonads of both ZZ and ZW partners suggested strongly the differentiation of ovaries (Fig. 8). They appeared as

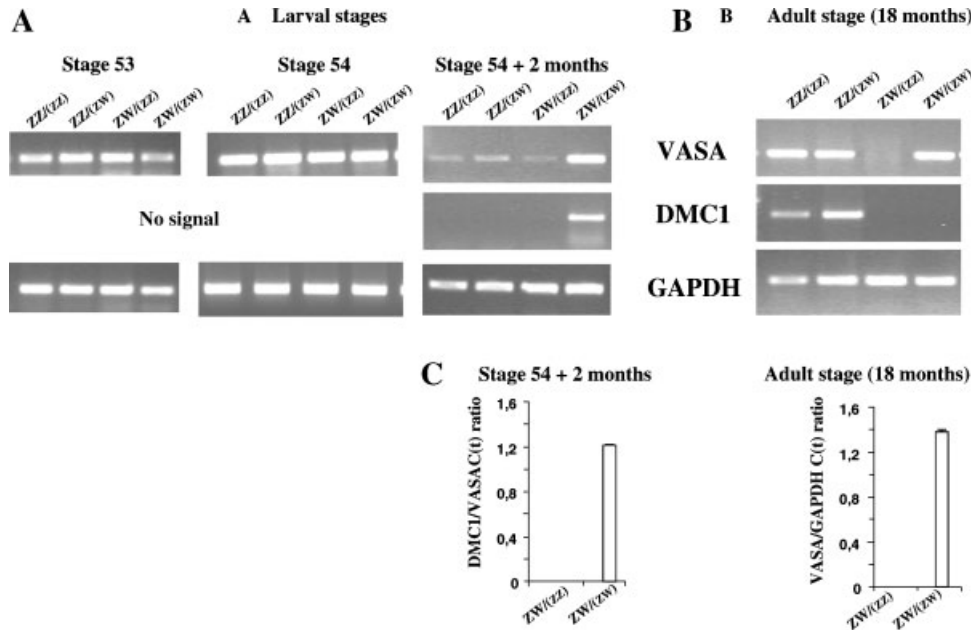


Fig. 5. Expression of germline markers (VASA and DMC1) in ZZ and ZW parabionts. **A:** Three GM were sampled and pooled from ZZ or ZW parabionts associated either with a ZZ [ZZ/(ZZ); ZW/(ZZ)] or ZW [ZW/(ZW); ZZ/(ZW)] partner at stage 54 + 2 months. Total RNA was reverse transcribed and amplifications of VASA or DMC1 were performed as described in Materials and Methods section. GAPDH amplification served as control for relative RNA amounts. Reverse transcription and

PCR amplifications were repeated twice on two RNA samples independently. **B:** The same protocol was used with gonadal samples from adult parabionts. **C:** Real-time PCR analyses of VASA and DMC1 expression were performed on the same cDNA samples. Results are expressed as the mean of C(t) ratios from triplicates. Vertical bars indicate the standard error of the mean.

flattened narrow bands along the antero-posterior axis. In the ZZ parabiont (Fig. 8C), on histological sections of the gonads, we observed a central cavity and a cortical position of germ cells, two features of the ovarian development. However, in some areas germ cells appeared associated in a common structure looking like a cyst whereas in other areas, growing oocytes were present. So, the E_2 -treated ZZ gonad looked like an ovotestis at this stage. In the ZW partner, sections of the gonad revealed an ovary with a central cavity and cortical germ cells (Fig. 8D). However, neither growing oocytes nor cysts could be detected. When compared to untreated ZW/(ZZ) gonads (Fig. 4), the E_2 -treated ZW/(ZZ) gonads rather displayed a normal ovarian development even if germ cells differentiation seems to be slightly delayed. So, in case of E_2 treatment, the inhibition of ZW gonad development does not occur.

DISCUSSION

Little is known about the natural sex hormones of *P. waltl* and the role they can play in sex differentiation. One approach used to study this aspect is parabiosis, a method by which two embryos are surgically associated and then develop together with a connection between their circulating system (Malacinski and Chung, 1996). The results of these experiments in terms of gonad differentiation have been described several decades ago from a histological point of view, without knowledge of parabiont genotypes since there was no marker of sex chromosomes (Gallien, 1973; Collenot et al., 1987). In the present study, wild type progenies were used to

realize parabioses. The analysis of the sex-linked marker peptidase-1 (Ferrier et al., 1980; Dournon et al., 1988), allowed us to identify the genotype of each parabiont in a pair early during larval life. Due to the mix of blood cells from the two parabionts, the result of peptidase-1 analysis could have been ambiguous since this marker is expressed ubiquitously, even in blood cells (Dorazi et al., 1995). In fact, this was not the case, probably because the tail end that is the source of tissue for peptidase analysis is not highly vascularized. Once the genotype ascertained we studied the histological and molecular phenotypes of the gonads at later stages of development.

At stage 54 + 3 months, whereas gonads from ZZ/ZZ and ZW/ZW parabioses are differentiated as usually observed in standard larvae, the ZW gonads of ZZ/ZW parabioses show an atypical aspect: there is no ovarian cavity, the medulla contains numerous somatic cells and only a few germ cells are detected at the periphery of the organ. At adulthood, the gonads are vestigial, and look like a fibrous structure where germ cells seem absent. Thus, the results of our study confirmed the inhibition of the ZW gonad development in cases of ZZ/ZW associations, as previously described by the use of parabioses performed between all male and all female progenies (Gallien, 1973; Collenot et al., 1987).

The main aim of our study was to better characterize the gonads of parabionts by counting the number of germ cells per gonad and analyzing two kinds of markers that are now available for *P. waltl*: germline specific genes and genes mainly expressed in gonadal somatic

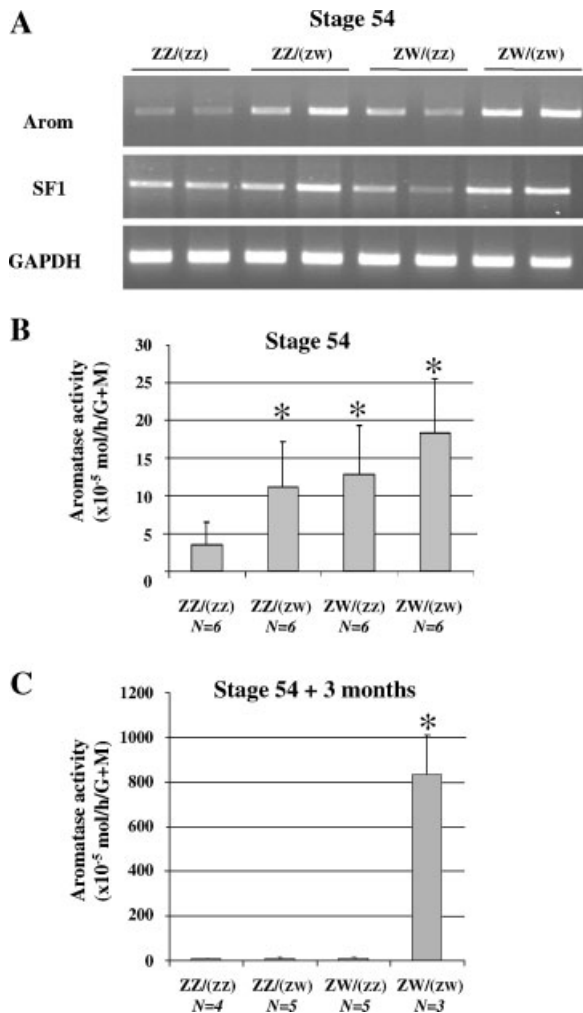


Fig. 6. A: Expression of somatic markers (P450-aromatase and SF1) in ZZ and ZW parabionts. Three GM were sampled and pooled from ZZ or ZW parabionts associated either with a ZZ [ZZ/(ZZ); ZW/(ZZ)] or ZW [ZW/(ZW); ZZ/(ZW)] partner at stage 54. Total RNA was reverse transcribed and amplifications of P450-aromatase and SF1 were performed as described in Kuntz et al. (2003b). Two samples from different parabionts are shown for each genotype. B: P450-aromatase activity in GM from ZZ or ZW parabionts at stage 54 associated either with a ZZ [ZZ/(ZZ); ZW/(ZZ)] or ZW [ZW/(ZW); ZZ/(ZW)] partner. Values are means of measurements performed on both complexes of several parabionts which number is indicated by N. Vertical bars indicate the mean standard error. *Significantly different from ZZ/ZZ ($P < 0.05$). C: P450-aromatase activity at stage 54 + 3 months (metamorphosis). The presentation of the results is similar to that in B.

cells. The counting as well as the expression profile of VASA mRNA, confirmed the presence of similar number of germ cells at stage 53 in the ZZ and ZW gonads of either homosex or ZZ/ZW associations. Therefore, both the migration of germ cells towards the genital ridge as well as germ cell proliferation in the early gonad seem to occur in all parabionts like in standard animals. From stage 54 to stage 54 + 2 months, ZW gonads from heterosex associations do not show germ cell proliferation in contrast to those from ZW/ZW associations. At adulthood, germ cells seem to have disappeared in the inhibited ZW gonad of ZZ/ZW associations as

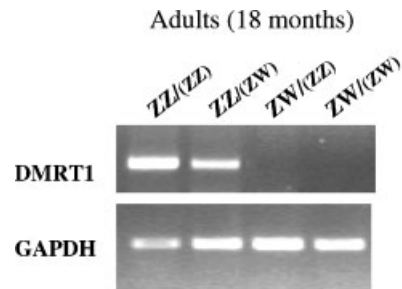


Fig. 7. Expression of DMRT1 mRNA, in ZZ and ZW adult parabionts associated either with a ZZ [ZZ/(ZZ); ZW/(ZZ)] or ZW [ZW/(ZW); ZZ/(ZW)] partner. Total RNA from 20 to 50 mg gonadal tissue was reverse transcribed and amplification of DMRT1 was performed as described in Materials and Methods section. GAPDH amplification served as a control for relative RNA amounts. Reverse transcription and PCR amplifications were repeated twice on two independent RNA samples.

demonstrated by the absence of VASA transcript and the histological examination. So, the loss of germ cells seems to take place mainly during the period of metamorphosis.

The second marker, DMC1, gave more information about germ cell function since it encodes a recombinase used by many authors as a marker of meiosis entry (Yazawa et al., 2003; Shinohara and Shinohara, 2004). Analysis of its expression clearly shows that at stage 54 + 2 months, germ cells in the inhibited ZW gonad do not enter meiosis in contrast to control ZW germ cells in ZW/ZW associations. This confirmed the histological data about germ cells nuclei (absence of chromatin condensation and low circularity index). In our opinion, the absence of DMC1 transcript cannot be an artifact due to the lower number of germ cells in ZW/(ZZ) gonads since cell counts revealed only a 2.4-fold difference with ZW/ZW gonads, which should have allowed a detection at least in real-time PCR analyses as illustrated for VASA. At adulthood, no DMC1 mRNA is detected in ZW gonads from ZZ/ZW associations whereas the transcript is present in ZZ gonads. Whether a failure in meiosis entry causes germ cell to die or to dedifferentiate during metamorphosis remains to be determined.

Furthermore, we studied several gonadal somatic cell genes. SF1 and P450-aromatase were chosen because they show a sexually dimorphic expression which is higher in ZW than ZZ larvae at stage 54 (Kuntz et al., 2003b, 2006). In ZZ/ZW parabioses, their expression levels in both ZZ and ZW GM were between those measured in ZZ/ZZ and ZW/ZW GM samples. This was also observed in case of P450-aromatase activity measurement at the same stage. Interestingly, intermediate germ cell numbers were also observed at this stage. Therefore, germline and somatic alterations begin mainly at early stage 54 in both sexes. So, initially, it seems that there is a reciprocal influence between the ZW and the ZZ gonads. Then, testis development in the ZZ parabiont is slightly delayed but occurs quite normally whereas the ZW gonad begins to degenerate. At stage 54 + 3 months, during metamorphosis, gonadal aromatase activity measurements in ZZ/ZW parabioses

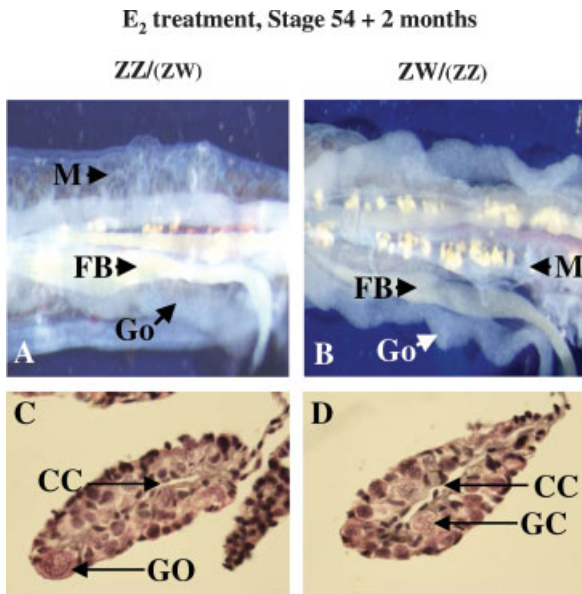


Fig. 8. Morphology and histology of gonads in parabiotic animals from heterosex associations at stage 54 + 3 months after E_2 treatment from stage 50. The dissected gonads have been subjected to morphological examination (A and B, $\times 30$) and then to a histological study (C and D, $\times 200$). Both ZZ and ZW individuals show gonads with an ovarian morphology (flattened narrow band) (A and B). On histological sections, the ZZ gonads display a central cavity and a cortex where cysts containing germ cells were present in some areas whereas growing oocytes could be observed in some others (C). The ZW gonads had a similar general structure but no cysts and no growing oocytes were detected (D). FB: fat body, GC: germ cells, Go: gonad, M: mesonephros, CC: central cavity, GO: growing oocyte.

clearly demonstrated a very low level of enzyme activity in gonads of both genotypes. Thus, somatic cells of the inhibited ZW gonad do not display the usual female biochemical features which are observed in gonads from ZW/ZW parabioses.

In order to determine if this absence of female markers in the somatic compartment of the ZW gonad was indicative of a masculinized phenotype, we also studied DMRT1. This is a testis-specific marker in vertebrates. In some amphibian species, the testis-specific expression profile might be present only in adults (Osawa et al., 2005). In *P. waltl*, DMRT1 mRNA expression was not detected in the inhibited ZW gonad in adult ZZ/ZW parabionts whereas it was expressed in ZZ gonads. Hence, it can be concluded that the somatic compartment of the gonad clearly remains undifferentiated. DMRT1 can be expressed in both germ cells and somatic cells, as described in mammals for instance (Pask et al., 2003). So, it might be interesting to determine in our model if the lack of DMRT1 expression in ZW/(ZZ) gonads really reflects a lack of masculinization or if it is due to the loss of germ cells which could be required for DMRT1 expression in the somatic compartment.

The reason for the inhibition of gonad development in ZW parabionts associated to ZZ partners is unknown. A substance produced by the ZZ individual probably acts on the ZW parabiont via the interconnected circulatory

systems. The ZZ gonad is very likely the source for this compound since orthotopic grafts of embryonic ZZ gonads into the abdominal cavity of ZW embryos gave similar results (Gallien, 1973). In that context, it is interesting to compare the results of parabiosis experiments with those of steroid-induced sex reversal. Treatments of ZW *Pleurodeles* larvae with non-aromatizable androgens lead most often to functional sex reversal but sometimes to inhibition of ZW gonad development associated to a reduction in the number of germ cells as observed in parabiosis (Chardard et al., 2003). However, the treatment of ZZ larvae with antiandrogens like flutamide does not affect testis differentiation (Chardard et al., 2003). Conversely, estradiol is a very efficient feminizing substance (Chardard et al., 2003). In the heterosex associations, there is a modest and transient increase in GM P450-aromatase activity at stage 54 in both parabionts. So the ZZ partner is not feminized probably because there is not a sustained production of E_2 in the ZW parabiont. We show here that E_2 treatment counteracts the inhibition of the ZW gonad development in ZZ/ZW associations. E_2 was applied at stage 50 when gonads are still undifferentiated and when no defects are detected in ZW gonad development (since gonads had a normal aspect at stage 53). So, exogenous E_2 probably induces an early feminization of the ZZ parabiont that cannot exert its inhibiting effect on the ZW partner.

The identity of the inhibiting substance produced by the ZZ partner is unknown. One might suggest that the anti-Müllerian hormone (AMH) could be involved in the amphibian model like in the freemartin effect in mammals (Capel and Coveney, 2004). Indeed, AMH not only triggers Müllerian ducts regression but also plays a part in gonad differentiation (Ross et al., 2003). This is clearly exemplified in fish where AMH is produced despite the absence of Müllerian ducts (Yoshinaga et al., 2004). In rodents, AMH blocks meiosis in fetal ovaries, leading to loss of germ cells and fibrous degeneration, and inhibits the transcription of aromatase, as observed for the ZW parabionts from ZZ/ZW associations (Vigier et al., 1989; Josso et al., 1998). The inhibiting effect of AMH on XX gonads has also been shown in the tammar wallaby (Whitworth et al., 1996). Nevertheless, since Müllerian ducts do not disappear during sex differentiation in ZZ individuals, it might be suggested that there is no AMH in *Pleurodeles*. Up to now, attempts to clone *P. waltl* AMH using degenerated primers were not successful. Besides, in preliminary studies, addition of mammalian AMH to the culture medium of *Pleurodeles* larvae ZW GM explants failed to reproduce the in vivo effects observed in parabiotic animals (our unpublished results). So, the presence and role of AMH in this species is still an open question.

Since it was recently demonstrated that meiosis entry is delayed in mouse fetal testis by the action of the retinoid-degrading enzyme CYP26B1, the inhibition of ZW gonad development in our parabiosis model could also involve retinoic acid (RA) metabolism (Bowles et al., 2006). Indeed, in organotypic cultures of *P. waltl* GM

complexes, RA can induce meiosis entry when applied before gonadal differentiation (stages 48–50) (our unpublished results). Moreover, RA can inhibit aromatase expression depending on the type of promoter used (Yanase et al., 2001; Rubin et al., 2002). Therefore, early synthesis of the RA-degrading enzyme in the ZW parabiont from heterosex associations, as a result of the action of a male circulating product, could (i) delay germ cell differentiation in the ZW gonad, (ii) lead to abnormal crosstalk between germline and the somatic compartment and (iii) induce gonad alterations. In vitro studies are currently performed in our lab in order to reproduce the effects observed in parabiotically associated animals and to identify the active compound.

The results of our study using wild type progenies confirm the effect of the ZZ parabiont on gonad development of its ZW partner. The first signs of ZW gonad alteration are observed at stage 54. The molecular markers that we have used demonstrate that germ cells are not only quantitatively but also qualitatively modified since they do not enter meiosis. Gonad alteration is also observed at the somatic level since P450-aromatase up-regulation does not occur. However, this is not the result of a masculinizing process as suggested by the absence of DMRT1 expression in the ZW gonads of ZZ/ZW parabioses. Taken together, our results demonstrate clearly an inhibiting action that is counteracted by E₂. Studies using E₂ and RA co-treatments are now required to mimic the in vivo situation and to identify the molecule(s) responsible for this freemartin-like effect in this urodele amphibian.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank J. Magdalou and M.-H. Piet for their help in radioactivity measurements, M. Chillet for histology, F. Amirache for germ cell counting and F. Küpper for a critical reading of the manuscript. We also thank J.-C. Olry and A. Iurétig for animal rearing. These studies were supported by grants of the Ligue Contre le Cancer (Comités de la Meurthe et Moselle et de la Meuse), of the Association pour la Recherche sur le Cancer, of the Conseil Régional de Lorraine and of the Université Henri Poincaré.

REFERENCES

- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksohak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312:596–600.
- Burns RK. 1925. The sex of parabiotic twins in amphibia. *J Exp Zool* 42:31–89.
- Capel B, Coveney D. 2004. Frank Lillie's freemartin: Illuminating the pathway to 21st century reproductive endocrinology. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301:853–856.
- Chardard D, Dournon C. 1999. Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltli*. *J Exp Zool* 283:43–50.
- Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dournon C. 1995. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltli* (urodele amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen Comp Endocrinol* 99:100–107.
- Chardard D, Kuntz S, Chesnel A, Flament S. 2003. Effects of androgen on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltli*. *J Exp Zool* 296:46–55.
- Collenot A, Gounon P, Collenot G. 1987. Aspects récents de l'étude de la différenciation sexuelle des amphibiens: étude de l'effet free-martin chez le triton *Pleurodèle*. *Mém Soc Zool France Symp L Gallien* 31–42.
- Dorazi R, Chesnel A, Dournon C. 1995. Opposite sex determination of gonads in two pleurodeles species may be due to a temperature-dependent inactivation of sex chromosomes. *J Heredity* 86:23–31.
- Dournon C, Houillon C. 1985. Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltli* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. *Reprod Nutr Dévelop* 25:671–688.
- Dournon C, Collenot A, Lauthier M. 1988. Sex-linked peptidase-1 patterns in *Pleurodeles waltli* Michah (Urodele Amphibian): Genetic evidence for a new codominant allele on the W sex chromosome and identification of ZZ, ZW and WW sexual genotypes. *Reprod Nutr Dev* 28:979–987.
- Dournon C, Houillon C, Pieau C. 1990. Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int J Develop Biol* 34:81–92.
- Ferrier V, Jaylet A, Cayrol C, Gasser F, Buisan JJ. 1980. Etude électrophorétique des peptidases érythrocytaires chez *Pleurodeles waltli* (Amphibien, Urodèle): mise en évidence d'une liaison avec le sexe. *C R Acad Sci Série D* 290:571–574.
- Gallien L. 1973. Différenciation et organogenèse sexuelle des métazoaires. Paris: Masson and Co. p. 141–84.
- Gallien L, Durocher M. 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltli*. *Bull Biol Fr Belg*; 91:97–114.
- Hayes TB. 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool* 281:373–399.
- Huchon D. 1971. Différenciation sexuelle et intersexualité dans la parabiose chez six espèces d'amphibiens anoures appartenant aux familles des Discoglossidae, Pelobatidae, Limnodynastidae. *Ann Emb Morphol* 4:237–268.
- Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F. 1998. The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 145:3–7.
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Flament S. 2003a. Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltli*. *Cytogenet Genome Res* 101:283–288.
- Kuntz S, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Duterque-Coquillaud M, Flament S, Chardard D. 2003b. Expression of P450aromatase during sex differentiation and sex reversal in the amphibian *Pleurodeles waltli*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:89–100.
- Kuntz S, Chardard D, Ko C-I, Dumond H, Ducatez M, Callier M, Flament S, Chesnel A. 2006. Female-enriched and thermosensitive expression of steroidogenic factor-1 during gonadal differentiation in *Pleurodeles waltli*. *J Mol Endocrinol* 36:175–186.
- Malacinski GM, Chung HM. 1996. Urodele (e.g. axolotl) embryos in the undergraduate laboratory class: An essay describing a multifaceted learning experience. *Int J Develop Biol* 40:901–905.
- Osawa N, Oshima Y, Nakamura M. 2005. Molecular cloning of Dmrt1 and its expression in the gonad of *Xenopus*. *Zool Sci* 22:681–687.
- Parvinen M. 2005. The chromatoid body in spermatogenesis. *Int J Androl* 28:189–201.
- Pask AJ, Behringer RR, Renfree M. 2003. Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis—from marsupials to mice. *Cytogenet Genome Res* 101:229–236.
- Ross AJ, Tilman C, Yao H, MacLaughlin D, Capel B. 2003. AMH induces mesonephric cell migration in XX gonads. *Mol Cell Endocrinol* 211:1–7.
- Rubin GL, Duong JH, Clyne CD, Speed CJ, Murata Y, Gong C, Simpson ER. 2002. Ligands for the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor inhibit aromatase cytochrome P450 (CYP19) expression mediated by promoter II in human breast adipose. *Endocrinology* 143:2863–2871.
- Shinohara A, Shinohara M. 2004. Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenet Genome Res* 107:201–207.
- Smith CA, McClive PJ, Western PS, Reed KJ, Sinclair AH. 1999. Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402:601–602.

- Vigier B, Forest MG, Eychenne B, Bezard J, Garrigou O, Robel P, Josso N. 1989. Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3684–3688.
- Whitworth DJ, Shaw G, Renfree MB. 1996. Gonadal sex reversal of the developing marsupial ovary in vivo and in vitro. *Development* 122:4057–4063.
- Yanase T, Mu YM, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H. 2001. Regulation of aromatase by nuclear receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79:187–192.
- Yazawa T, Nakayama Y, Fujimoto K, Matsuda Y, Abe K, Kitano T, Abe S, Yamamoto T. 2003. Abnormal spermatogenesis at low temperatures in the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*: Possible biological significance of the cessation of spermatocytogenesis. *Mol Reprod Develop* 66:60–66.
- Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, Iguchi T, Abe S, Kitano T. 2004. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem Biophys Res Commun* 322:508–513.

RESUME

Chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*, les stéroïdes jouent un rôle prépondérant dans la différenciation des gonades. De plus, une inversion sexuelle peut être induite par différents facteurs comme la température d'élevage ou les stéroïdes exogènes (oestrogènes et androgènes). L'objectif de la thèse était double : étudier l'effet d'oestrogéno-mimétiques et caractériser l'expression des récepteurs des oestrogènes et des androgènes.

Parmi tous les composés que nous avons testés, butylhydroxyanisole, 4-octylphénol, bisphénol-A, atrazine, zéaralénone et éthynyloestradiol, seul ce dernier a entraîné l'inversion sexuelle de larves génétiquement mâles (ZZ). Ce composé est plus efficace que l'oestradiol (10µg/l vs 100µg/l). A la concentration de 100ng/l, dose susceptible de se retrouver en milieu naturel, le développement des testicules n'est pas perturbé mais le développement des canaux de Müller est stimulé. La différenciation des oviductes chez les larves ZZ pourrait donc constituer un bon indicateur du potentiel oestrogéno-mimétique de diverses molécules.

Le récepteur α des oestrogènes et le récepteur des androgènes ont été clonés et leur expression analysée dans différentes conditions. Chez l'adulte, l'ARN messager d'ER α est présent spécifiquement dans les tissus reproducteurs. Chez les larves, par PCR en temps réel et par hybridation *in toto*, nous observons un taux de messagers codant ER α plus élevé dans les gonades femelles que dans les gonades mâles. Cependant, cette différence apparaît au stade 54^{30d} après l'augmentation d'expression de l'aromatase (stade 54). Lors de l'élevage des larves ZW à 32°C, l'expression d'ER α est inhibée et la différence entre gonades ZZ et gonades ZW n'est plus observée. Les stéroïdes sexuels n'influencent pas l'expression d'ER α dans les gonades, en revanche les traitements par la testostérone et la DHT provoquent une forte augmentation de l'expression d'ER α dans le compartiment mésonéphros-organe interrénal.

Un fragment du promoteur de l'ER α a aussi été cloné. De nombreux éléments de réponse putatifs ont été identifiés par comparaison de séquences. La mutagenèse dirigée a mis en évidence un élément de fixation du facteur CTCFL/BORIS susceptible de réguler l'expression.

Une séquence partielle du récepteur des androgènes a été isolée. Chez l'adulte, l'ARN messager montre un profil d'expression ubiquiste. En revanche, un anticorps polyclonal produit à partir d'une protéine recombinante, montre que la protéine AR n'est présente que dans le testicule, l'ovaire, le cerveau, la rate et l'oviducte. Chez les larves, le taux d'ARN messagers est plus élevé dans les gonades femelles que dans les gonades mâles aux stades 54^{15d} et 543^{0d}. L'effet des hormones stéroïdes sur l'expression d'AR reste difficile à interpréter.

Ces études apportent des données nouvelles, utiles à la caractérisation de la différenciation sexuelle du pleurodèle. Elles confirment l'importance de la signalisation oestrogénique pour la différenciation ovarienne et montrent que certains oestrogéno-mimétiques peuvent induire la différenciation des oviductes chez les mâles voire inverser leur sexe.