# Étude des gènes de la sexualisation de la gonade chez Pleurodeles waltl

Sandra Kuntz

▶ **To cite this version:**

Sandra Kuntz. Étude des gènes de la sexualisation de la gonade chez Pleurodeles waltl. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2004. Français. NNT : 2004INPL036N . tel-01749692

**HAL Id: tel-01749692**
**https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749692**

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

136036 8853

04INPL036N

TD 2004 KUNTZ, S.

# INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

**Ecole doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement**

## THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de L'INPL

*Discipline : Sciences Agronomiques*

par

Mlle KUNTZ Sandra

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

# *Etude des gènes de la sexualisation de la gonade chez Pleurodeles waltl.*

présentée et soutenue publiquement le 22 juin 2004

devant le jury composé de:

**Rapporteurs** : **Mme Solange Magre,** Sous-directrice au Collège de France, Paris
**Mme Corinne Cotinot**, Directeur de Recherche INRA, Paris

**Examinateur** : **Mr Jean François Baroiller**, Chargé de recherche CIRAD, Montpellier

**Directeur de thèse** : **Mr Stéphane Flament**, Professeur, Nancy

**Co-directeur de thèse** : **Mr François Laurent**, Professeur, Nancy

---

EA 3442 Génétique, Signalisation, Différenciation. Université Henri Poincaré – Nancy I. Faculté des Sciences – BP 239 - 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex France.

*Je tiens à tout d'abord à remercier Mr Christian Dournon, directeur du laboratoire de Biologie Expérimentale, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour mon DEA puis au cours de cette thèse.*

*J'exprime tous mes remerciements aux membres du jury, Mme Magre Solange, Sous-directrice au Collège de France, Mme Cotinot Corinne, Directeur de Recherche INRA, Mr Baroiller Jean-François, Chargé de recherche CIRAD et Mr Laurent François, Professeur à l'ENSAIA, d'avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et de juger mon travail.*

*Je remercie très sincèrement, Mr le Professeur Stéphane Flament, mon directeur de thèse, ainsi que Mrs les Docteurs Amand Chesnel et Dominique Chardard, pour avoir assuré l'encadrement de cette thèse, mais surtout pour leurs disponibilités, les discussions scientifiques ainsi que leurs conseils au cours de la rédaction ce manuscrit.*

*J'exprime aussi mes remerciements à Mme le Professeur Martine Duterque pour m'avoir accueillie pendant une semaine à l'Institut de Biologie de Lille. (UMR 8526 CNRS) et de m'avoir initié à la technique d'hybridation in situ.*

*Merci également à Mme Hélène Dumont pour avoir accepté de relire ce manuscrit.*

*Je remercie aussi Mme Martine Callier pour sa sympathie et son aide technique surtout pendant la rédaction du manuscrit.*

*Je remercie également tous les autres membres du laboratoire, pour leur accueil, leur bonne humeur et leur soutien au cours de la thèse.*

*Je tiens particulièrement à remercier Mmes Armelle Ropars et Isabelle Grillier-Vuissoz pour les conseils scientifiques et techniques au cours de ces quatres années. Un grand merci à Mme Sylvie Laine pour sa contribution dans la préparation de la banque de données de références bibliographiques. Mais aussi à Mlles Rachel Boxio et Natacha Steinckwich, pour les bons moments partagés au cours de ces quatre années.*

*Je tiens aussi à remercier Mlle Mariette Ducatez pour sa bonne humeur et sa participation à une partie du travail au cours de son année de DEA.*

*Je remercie aussi mon compagnon et mon entourage, pour leur patience et leur soutien.*

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES ..... 3

ABREVIATIONS ..... 6

INTRODUCTION ..... 7

I) MISE EN PLACE DE LA GONADE INDIFFERENCIEE ..... 8
**1) Contrôle de la migration des cellules germinales ..... 9**
**2) Construction précoce des structures urogénitales ..... 9**
**3) Wt1 intervient dans l'organogénèse du rein et de la gonade bipotentielle ..... 11**
A) structure moléculaire ..... 11
B) Rôle de Wt1 ..... 13
**4) Sf1 intervient dans la mise en place des tissus stéroïdogéniques ..... 14**
A) structure moléculaire ..... 14
B) Rôle de Sf1 ..... 15
**5) Formation des crêtes génitales ..... 16**
II) LA DETERMINATION SEXUELLE ..... 18
**1) Déterminisme génétique du sexe ..... 18**
A) Le gène déterminant chez les mammifères : Sry ..... 18
*a) structure moléculaire* ..... 19
*b) Rôle de Sry* ..... 20
B) Un gène déterminant chez les marsupiaux : Atry ..... 21
C) Un gène déterminant chez les oiseaux : ASW (Avian Sex specific, W-linked) ..... 22
D) DMY : un gène déterminant chez le poisson medaka ..... 23
*a) structure moléculaire* ..... 23
*b) Rôle de DMY* ..... 23
**2) La détermination sexuelle par l'environnement (ESD) ..... 24**
III) LA DIFFERENCIATION SEXUELLE ..... 27
**1) Les différents gènes impliqués dans la différenciation sexuelle ..... 28**
A) Induction de la prolifération cellulaire ..... 28
B) Migration des cellules du mésonephros et formation des cordons testiculaires ..... 29
C) La différenciation des cellules de Leydig ..... 31
D) Induction de la différenciation des cellules de Sertoli ..... 31
E) Le gène Sox9 ..... 32
*a) structure moléculaire* ..... 34
*b) Rôle de Sox9* ..... 36
*c) Régulation de la transcription du gène Sox9* ..... 37
*d) Gènes cibles de Sox9* ..... 38
F) Le gène Sf1 ..... 38
G) Le gène Dmrt1 ..... 39
*a) structure moléculaire* ..... 39
*b) Rôle de Dmrt1* ..... 40
H) Les autres gènes de la différenciation mâle ..... 42
I) SRY : un répresseur de la voie femelle ..... 43
J) un gène déterminant ovarien : Foxl2 ..... 46
**2) Le rôle des stéroïdes dans la différenciation sexuelle ..... 47**
A) Biosynthèse des stéroïdes ..... 48
*a) l'aromatase* ..... 49
*b) Structure génomique et expression tissu spécifique de l'aromatase* ..... 50
C) Rôle des stéroïdes chez les mammifères ..... 53
D) Rôle des stéroïdes chez les vertébrés non mammaliens ..... 54
*a) Le rôle des androgènes* ..... 55
*b) Le rôle des œstrogènes* ..... 56
*c) L'aromatase* ..... 56
* Mesure d'activité ..... 56
* Mesure d'expression ..... 57
* Inhibiteurs d'aromatase ..... 58
* Effet de la température ..... 59
* Aromatase, cerveau et différenciation gonadique ..... 60
* Régulation de l'aromatase au niveau cérébral et gonadique ..... 62
IV) LA DIFFERENCIATION DU TRACTUS GENITAL ..... 64
**1) Différenciation du tractus mâle ..... 66**
A) Synthèse de testostérone ..... 66
B) Synthèse d'AMH ..... 66
*a) Expression de l'AMH* ..... 66
*b) Régulation de l'AMH* ..... 67

C) Synthèse d'Insl3 ..... 68
**2) Différenciation du tractus femelle ..... 69**
V) LE MODELE : *PLEURODELES WALTL* ..... 70
**1) Développement morphologique et différenciation histologique des gonades ..... 70**
**2) La détermination du sexe ..... 74**
**3) Modification de la différenciation sexuelle ..... 76**
A) Influence de la température ..... 76
B) Influence des hormones stéroïdes sexuelles ..... 76
**4) L'aromatase et la différenciation gonadique femelle ..... 77**
VI) OBJECTIF DE L'ETUDE ..... 79

**RESULTATS ..... 80**

I. L'AROMATASE ET LA DIFFERENCIATION SEXUELLE CHEZ *PLEURODELES WALTL* ..... 80
**1) Etude de l'expression de l'aromatase au cours de la différenciation gonadique ..... 80**
A) Introduction ..... 80
B) Principaux résultats ..... 81
C) Conclusion ..... 84
* Article 1 ..... 85
**2) Synthèse sur le rôle des stéroïdes et de l'aromatase au cours de la différenciation sexuelle chez *Pleurodeles waltl* ..... 86**
* Article 2 (revue). ..... 88
**3) Etude de l'expression de l'aromatase dans le cerveau pendant la différenciation gonadique .... 89**
A) Introduction ..... 89
B) Principaux résultats ..... 89
C) Conclusion ..... 93
*Article 3 ..... 94
**4) Présence de transcrits aromatase dans le poumon adulte chez *Pleurodeles waltl* ..... 95**
A) Introduction ..... 95
B) Principaux résultats ..... 95
C) Conclusion ..... 98
*Article 4 ..... 99
II. ETUDE DE DIFFERENTS GENES SUSCEPTIBLES D'ETRE IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION SEXUELLE 100
**1) Rôle de Sf1 dans la différenciation gonadique chez Pleurodeles waltl ..... 100**
A) Introduction ..... 100
B) Principaux résultats ..... 101
C) Conclusion ..... 103
*Article 5 ..... 104
**2) Etude de l'expression de Sox9 au cours de la différenciation sexuelle chez Pleurodeles waltl. 105**
A) Introduction ..... 105
B) Matériel et Méthodes ..... 106
*a) Animaux* ..... 106
*b) Clonage du gène Sox9* ..... 106
*c) Analyse par RT-PCR* ..... 108
*d) Analyses statistiques* ..... 109
C) Résultats ..... 111
*a) Clonage de l'ADNc de Sox9* ..... 111
*b) Sox9 est exprimé dans de nombreux tissus adultes* ..... 113
*c) Les transcrits Sox9 sont présents dans le cerveau au cours de la TSP* ..... 114
*d) Le messager Sox9 est détecté très tôt au cours de la TSP dans les complexes gonades-mésonéphros* ..... 114
*e) Le niveau des transcrits Sox9 augmente dans le complexe gonades-mésonéphros des larves ZZ après la métamorphose* ..... 115
*f) Le niveau de transcrits Sox9 n'est pas significativement différent dans les gonades de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ au stade 55* ..... 117
D) Discussion ..... 117
**3) Recherche d'un gène impliqué dans la différenciation testiculaire chez *Pleurodeles waltl* ..... 123**
A) Introduction ..... 123
B) Matériel et Méthodes ..... 124
*a) Animaux* ..... 124
*b) Clonage du gène Dmrt1* ..... 124
*c) Analyse par RT-PCR* ..... 125
*d) Extraction et PCR sur ADN génomique* ..... 127
*e) Analyses statistiques* ..... 127
C) Résultats ..... 129
*a) Clonage de l'ADNc de Dmrt1* ..... 129
*b) Dmrt1 semble être autosomal chez Pleurodeles waltl* ..... 131
*c) Dmrt1 est exprimé spécifiquement dans le testicule des animaux adultes* ..... 131
*d) Dmrt1 est exprimé très tôt au cours du développement, indépendamment du sexe génétique* ..... 132
*e) Dmrt1 est significativement plus exprimé chez les larves ZW au stade 55* ..... 132

*f) Dmrt1 fait l'objet d'un épissage alternatif* ... 133
*g) L'expression de Dmrt1 disparaît des gonades femelles au stade juvénile* ... 137
D) Discussion ... 137
**4) Recherche de gènes différentiellement exprimés pendant l'inversion sexuelle chez *Pleurodeles waltl*** ... **141**
A) Introduction ... 141
B) Matériel et méthodes ... 142
*a) Extraction des ARNs totaux* ... 142
*b) Synthèse et amplification des ADNc* ... 142
*c) Hybridation soustractive* ... 142
*d) Criblage par PCR des clones transformants* ... 143
*e) Criblage par hybridation des clones d'intérêt* ... 143
C) Résultats ... 146
D) Discussion ... 150

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES** ... **151**

I) REGULATION DE L'AROMATASE ET DIFFERENCIATION GONADIQUE ... 151
**1) Expression de l'aromatase** ... **151**
**2) Régulation de l'aromatase par la testostérone** ... **153**
**3) Autres gènes susceptibles d'être impliqués dans la différenciation gonadique chez le pleurodèle** ... **154**
A) Expression de Sf1 ... 155
B) Expression de Sox9 ... 156
C) Expression de Dmrt1 ... 157
D) Recherche d'une cible de la température ... 159
II) LE CERVEAU N'EST PAS UN SITE DE REPONSE A LA TEMPERATURE CHEZ NOTRE MODELE ... 159
III) PERSPECTIVES ... 160

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ... **163**

**ANNEXES**

*Annexe 1
Chardard D., Kuntz S., Chesnel A., Flament S.
"Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*" 2003.

*Annexe 2
Flament S., Kuntz S., Chesnel A., Grillier-Vuissoz I., Tankosic C., Penrad-Moyabed M., Auque G., Shirali H., Schroeder H., Chardard D.
" Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibien)" 2003.

# ABREVIATIONS

**AMH** : Anti - Müllerian Hormone

**AR** : Androgen Receptor

**DBD** : DNA Binding Domain

**DHT** : DiHydroTestostérone

**DM** : *Doublesex Mab-3*

**ER** : Estrogen Receptor

**ESD** : Environnemental Sex Determination

**FTZ-F1** : Fushi TaraZu Factor 1

**GAPDH** : GlycérAldéhyde 3-Phosphate DésHydrogénase

**GSD** : Genetic Sex Determination

**jpc** : Jour Post-Coïtum

**LBD** : Ligand Binding Domain

**MMLV** : Moloney Murine Leukemia Virus

**NLS** : Nuclear Localisation Signal

**ORF** : Open Reading Frame

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PDGF** : Platelet-Derived Growth Factors

**RACE** : Rapid Amplification of cDNA Ends

**RT** : Reverse Transcription

**SF1** : Steroidogenic Factor 1

**SM** : Tampon de dilution du phage λ.

**Sox** : Sry bOX (SOX pour la protéine)

**Sry** : Sex determining Region of the Y chromosome (SRY pour la protéine)

**Taq** : *Thermus aquaticus*

**TSD** : Temperature-dependent Sex Determination

**TSP** : ThermoSensitive Period

**UTR** : UnTranslated Region

**Wt1** : Wilm's tumor 1

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

L'orientation de la différenciation gonadique vers le sexe mâle ou femelle est sous le contrôle de deux grands types de détermination différents : génétique ou environnemental. Dans le premier cas, le développement des gonades de l'embryon est dirigé par un ou plusieurs gènes déterminants localisés sur l'un des deux chromosomes sexuels. Ainsi, chez les mammifères, la présence du chromosome Y est déterminante et dirige le développement mâle. Contrairement à ces derniers, le dosage du chromosome X joue un rôle important dans la différenciation sexuelle chez la drosophile et le nématode *Caenorhabditis elegans* : le rapport du nombre de chromosomes X sur le nombre d'autosomes est le signal déterminant chez la drosophile. Chez le poulet, il est impossible de trancher entre l'influence du dosage du chromosome Z ou la présence d'un déterminant femelle sur le chromosome W à cause de la létalité embryonnaire précoce des animaux ZO et ZZW.

Chez d'autres espèces, ce n'est plus un mécanisme de type génétique qui contrôle la détermination du sexe mais des facteurs environnementaux dont le plus étudié est la température. Ce dernier mode de détermination a été bien décrit chez les reptiles où la température d'incubation des œufs influence la différenciation sexuelle. Notre modèle *Pleurodeles waltl* présente un déterminisme génétique du sexe de type ZZ/ZW où le chromosome W est le déterminant femelle. Néanmoins, ce déterminisme génétique du sexe peut être modifié par des facteurs environnementaux comme la température ou un traitement par des hormones stéroïdes appliquées pendant une période critique du développement.

Quelque soit le mode de détermination du sexe, les gènes situés en amont de la cascade génétique ont évolué rapidement alors que ceux qui sont plus en aval, impliqués dans le processus de la différenciation sexuelle sont conservés entre les différentes espèces. Les principaux gènes connus pour intervenir dans les différents évènements, de la mise en place des gonades à la détermination et différenciation sexuelle, ont été pour la plupart décrits chez les mammifères puisque l'essentiel des travaux rapportés a été réalisé chez l'homme et la souris. Au cours de cette introduction, nous développerons les principaux gènes impliqués dans ces différentes étapes en ne détaillant que ceux qui ont été analysés au cours de ce travail de recherche. Dans la dernière partie, nous présenterons notre modèle d'étude, puis nous terminerons par la présentation des différents objectifs de cette étude.

# I) Mise en place de la gonade indifférenciée

La mise en place des gonades débute par l'élaboration d'ébauches gonadiques, dites bipotentielles car elles ont la possibilité de se différencier soit en testicule, soit en ovaire. Les ébauches gonadiques sont alors constituées de trois éléments : les crêtes génitales, les cellules germinales primordiales et le blastème mésonéphrétique (Fig.1).

Les crêtes génitales se forment suite à l'épaississement de l'épithélium cœlomique dorsal, au niveau de la surface ventro-médiane du mésonéphros. Simultanément, les cellules germinales primordiales, d'origine extragonadique, migrent vers les crêtes génitales puis les colonisent. Un blastème mésonéphrétique se met alors en place entre les crêtes génitales et le mésonéphros. L'origine de ce blastème est incertaine et fait l'objet de plusieurs théories.

De nombreux gènes interviennent dans le processus de construction des gonades indifférenciées. Ils ont pu être mis en évidence grâce à l'étude des malformations gonadiques. Au cours de ce chapitre, les principaux gènes jouant un rôle dans la mise en place des gonades indifférenciées seront présentés et nous ne détaillerons que ceux qui ont été recherchés et étudiés chez notre modèle.

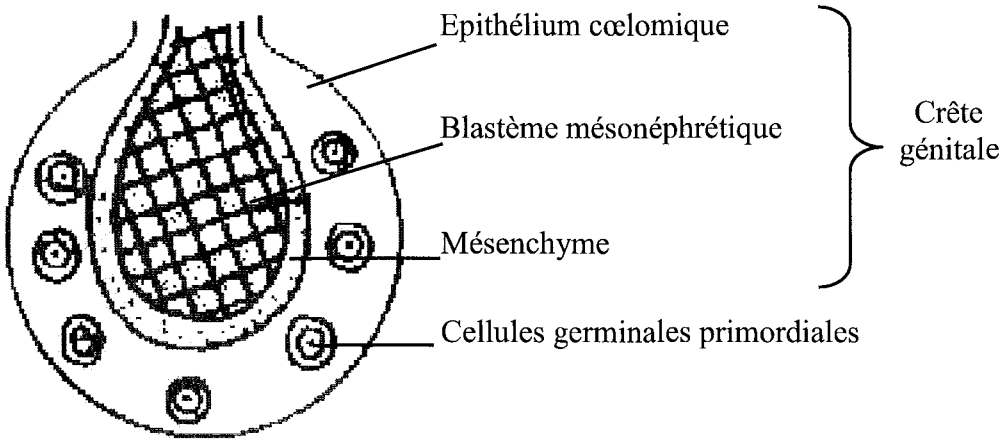



**Figure 1 :** Schéma d'une ébauche gonadique. La gonade indifférenciée est constituée d'un cortex issu de la prolifération de l'épithélium cœlomique qui est colonisé par les cellules germinales primordiales. Au centre, la prolifération du blastème mésonéphrétique donne naissance à la medulla. Cette dernière et le cortex sont séparés par un mésenchyme d'origine mésonéphrétique (modifié d'après Thibault C. *et al.*, 1998).

### 1) Contrôle de la migration des cellules germinales

Chez la souris, le gène White spotting codant un récepteur tyrosine kinase c-kit, le gène Steel codant un ligand pour c-kit et le gène TIAR codant une protéine de liaison à l'ARN, contrôlent la migration et la prolifération des cellules germinales ainsi que la colonisation des crêtes génitales par ces dernières. La mutation de l'un de ces gènes conduit à une diminution du nombre de cellules germinales au niveau des crêtes génitales (Keshet E. *et al.*, 1991; Beck A.R. *et al.*, 1998).

### 2) Construction précoce des structures urogénitales

Emx2 est un gène à homéobox qui est homologue au gène empty spiracles (ems) de la drosophile. Chez la souris, Emx2 est exprimé dans le cerveau en développement (Simeone A. *et al.*, 1992) et le système urogénital au niveau des crêtes génitales, des canaux de Wolff et de Müller, de l'épithélium du pronéphros et du mésonéphros (Pellegrini M. *et al.*, 1997). Ce gène joue un rôle essentiel dans la morphogenèse du système urogénital puisque la mutation homozygote $Emx2^{-/-}$ conduit à une absence complète des reins, gonades, uretères et des voies génitales (Fig.2) (Miyamoto N. *et al.*, 1997).

Lim1 est également impliqué précocement dans la formation des gonades et du rein (Fig.2). Lim1 est un gène à homéobox qui code une protéine contenant en plus du domaine de liaison à l'ADN, deux domaines en doigts de zinc LIM, impliqués dans les interactions protéine-protéine. Ce gène a des fonctions à la fois au niveau du développement cérébral et du système urogénital (Fujii T. *et al.*, 1994). Chez la souris, au cours du développement embryonnaire, Lim1 est exprimé dans les canaux mésonéphrétiques et le mésoderme intermédiaire à partir duquel les gonades vont se former (Barnes J.D. *et al.*, 1994). Une délétion homozygote de ce gène chez des embryons de souris conduit à une absence de reins et de gonades, et la plupart meurent *in utero* à 10 jpc (jours post-coïtum) (Shawlot W. et Behringer R.R., 1995).

Le gène Pax2 est, comme Lim1, essentiel pour les phases précoces du développement rénal mais il n'intervient pas dans la formation des gonades. C'est un facteur de transcription, membre de la famille «paired-box», largement exprimé dans le système urogénital au cours du développement. Les souris mutantes homozygotes $Pax2^{-/-}$ développent des gonades et des surrénales, cependant les reins et les canaux urogénitaux sont absents (Torres M. *et al.*, 1995).

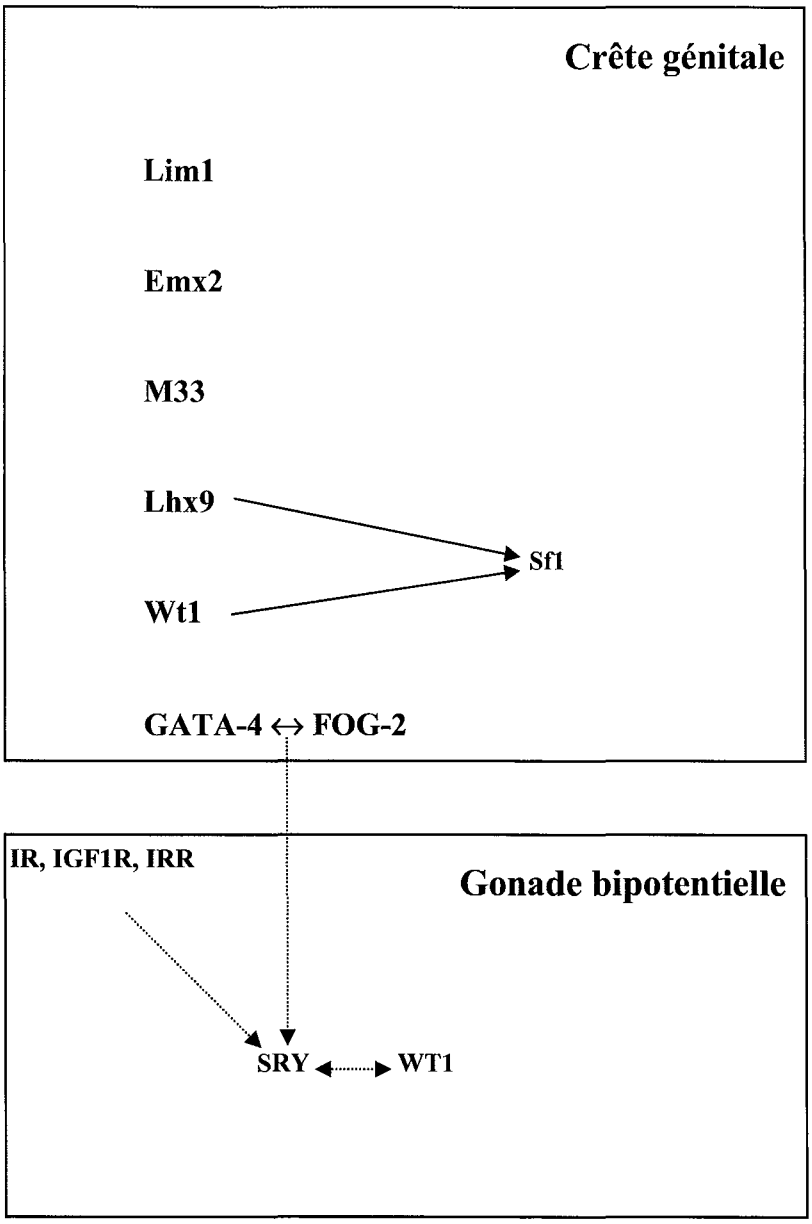



**Figure 2 : Gènes impliqués dans la mise en place de la gonade indifférenciée.** Les différentes interactions entre les gènes sont représentées par des flèches pour une activation. GATA-4 et son cofacteur FOG-2 sont reliés par une flèche. Les régulations du gène Sry (voir chapitre suivant), directe ou indirecte, ainsi que son interaction avec la protéine WT1 *in vitro* sont indiquées par des flèches en pointillés.

Au cours du développement rénal, la forme WT1(-KTS) inhibe la transcription du gène Pax2 par l'intermédiaire de trois sites de liaison situés dans son promoteur (Ryan G. *et al.*, 1995). Ainsi, dans les conditions normales, l'expression de Pax2 diminue brutalement au moment de la différenciation de l'épithélium tubulaire, alors que dans les cellules de tumeurs de Wilm, mutée pour Wt1 (voir plus loin), l'expression de Pax2 est persistante dans les cellules épithéliales peu différenciées, induisant leur prolifération (Dressler G.R. et Douglass E.C., 1992).

### 3) Wt1 intervient dans l'organogénèse du rein et de la gonade bipotentielle

Le gène Wt1 (Wilms' tumor suppressor gene wt1) a été cloné en 1990 chez l'homme et sa localisation sur le chromosome 11 a suggéré son implication dans le développement de la tumeur de Wilm (Call K.M. *et al.*, 1990). Cette tumeur rénale embryonnaire est généralement associée à d'autres anomalies congénitales, particulièrement dans trois types de syndromes (Little M. et Wells C., 1997). Le syndrome de WAGR (Wilms' tumor, Aniridia, Genitourinary abnormalities, mental Retardation), qui est dû à une délétion du gène Wt1, est caractérisé par un retard mental, une aniridie et une malformation urogénitale. Le syndrome de Denys Drash, traduit par une malformation génitale, une sclérose rénale mésangiale et différents degrés d'inversion sexuelle, est causé par une mutation du gène Wt1 touchant la capacité de liaison de la protéine sur l'ADN. Enfin, le syndrome de Frasier où la mutation est localisée dans le site d'épissage conduisant à la perte de la forme +KTS, se manifeste par une malformation génitale, une inversion sexuelle et une sclérose focale glomérulaire sans développement de tumeur de Wilm.

#### A) structure moléculaire

Le gène code un facteur de transcription qui possède 4 domaines à doigts de zinc dans la partie C-terminale et un domaine de transactivation riche en glutamine et proline dans la partie N-terminale (Call K.M. *et al.*, 1990). WT1 est une protéine nucléaire, deux signaux de localisation nucléaire ont en effet été identifiés, le premier à l'intérieur du premier doigt de zinc et le deuxième entre les doigts de zinc deux et trois (Bruening W. *et al.*, 1996). Grâce à son domaine de transactivation, WT1 peut agir soit comme un répresseur, soit comme un activateur transcriptionnel selon le contexte cellulaire. Dans la partie N-terminale, la protéine comporte à la fois un domaine d'activation (acides aminés

180-294) et un domaine de répression (acides aminés 84-179). Ces domaines régulateurs fonctionnent indépendamment et les effets divergents de la protéine WT1 dépendent de la présence et de la position des sites de liaison pour WT1 dans les éléments de réponse des gènes cibles (Wang Z.Y. *et al.*, 1993).

La région codante comprend 10 exons et chaque doigt de zinc est codé par un exon différent (Fig.3). L'analyse fonctionnelle de ce gène est compliquée puisqu'il existe au moins 24 isoformes de WT1. Notamment, deux évènements d'épissage alternatif conduisent à quatre transcrits distincts (Haber D.A. *et al.*, 1991). Le premier épissage conduit à une insertion de 17 acides aminés qui compose l'exon 5 (Fig.3). Cette insertion comprend au moins cinq sérines et une thréonine qui sont des sites potentiels de phosphorylation. Le deuxième épissage alternatif conduit à l'insertion (WT1+KTS) ou à l'absence (WT1-KTS) de trois acides aminés : lysine, thréonine, sérine (KTS) entre le troisième et quatrième doigt de zinc (Fig.3). L'insertion KTS modifie les propriétés de liaison à l'ADN. La forme WT1(-KTS) est localisée dans le noyau associée aux facteurs de transcription tandis que la forme WT1(+KTS) est préférentiellement associée aux facteurs généraux d'épissage (Larsson S.H. *et al.*, 1995). Ainsi, WT1 semble jouer à la fois un rôle dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Seule l'insertion KTS est observée chez les vertébrés non mammaliens. L'insertion de l'exon 5 n'est constatée que chez les mammifères (Kent J. *et al.*, 1995).

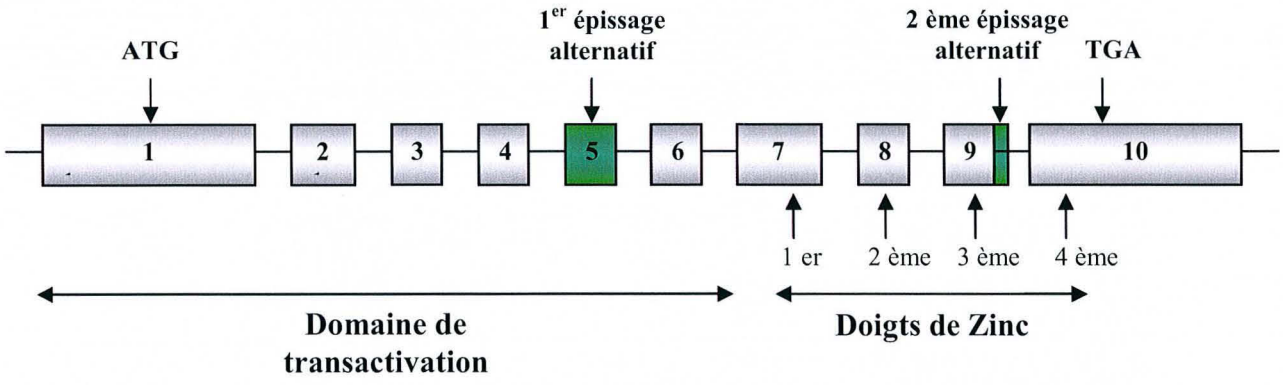



**Figure 3 :** Structure génomique de Wt1. Les 10 exons sont représentés dans les cadres gris et sont séparés par les introns (traits). Les deux cadres figurés en vert indiquent les deux insertions possibles dues aux évènements d'épissage alternatif. La protéine WT1 comporte 449 acides aminés chez l'homme, elle possède quatre doigts de zinc (emplacement indiqué par des flèches) et un domaine de transactivation (modifié, d'après Haber D.A. *et al.*, 1991; Lee S.B. et Haber D.A., 2001).

B) Rôle de Wt1

Wt1 semble participer à la construction de la gonade bipotentielle où il est exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire. Chez la souris comme chez le poulet et les reptiles, Wt1 est tout d'abord exprimé dans le mésoderme intermédiaire (Armstrong J.F. *et al.*, 1993; Kent J. *et al.*, 1995). Ensuite, le messager est détecté dans les crêtes urogénitales, dérivées du mésoderme (Armstrong J.F. *et al.*, 1993). Le rôle essentiel de Wt1 au cours du développement urogénital précoce a été démontré chez des souris présentant des délétions homozygotes pour le gène Wt1. Cette inactivation conduit à un phénotype sévère entraînant une létalité embryonnaire avec une absence de gonades, de reins et de surrénales (Kreidberg J.A. *et al.*, 1993). L'implication très précoce de Wt1 dans la mise en place des gonades indifférenciées est conservée chez l'humain (Hanley N.A. *et al.*, 1999), le xénope (Semba K. *et al.*, 1996), la tortue *Trachemys scripta* (Spotila L.D. *et al.*, 1998) et l'alligator (Western P.S. *et al.*, 2000).

La fonction des isoformes +KTS et -KTS a pu être analysée grâce à la production de souris knock-out n'exprimant que l'une des deux formes (Hammes A. *et al.*, 2001). Dans les deux cas, les souris meurent 24 heures après la naissance. Celles qui présentent une mutation de la forme +KTS, représentent un modèle du syndrome de Frasier. Chez ces souris, le rein est non fonctionnel et elles se développent toutes en femelles quel que soit le sexe génétique. Chez les souris dont la forme –KTS est absente, le rein ne se développe pas, les gonades sont réduites en taille, avec une différenciation anormale des canaux génitaux. Ainsi, la forme –KTS paraît essentielle pour la prolifération cellulaire gonadique tandis que la forme +KTS apparaît être impliquée dans la détermination sexuelle en activant le développement mâle (Hammes A. *et al.*, 2001). Chez l'homme, le syndrome de Frasier est caractérisé par la production de la forme -KTS uniquement. Ce défaut d'épissage alternatif conduit à une surexpression du gène Dax-1 qui va interférer avec la détermination mâle et entraîner des inversions sexuelles (Kim J. *et al.*, 1999; Swain A. *et al.*, 1998).

Récemment, une interaction impliquant le domaine à doigts de zinc des protéines WT1 (-KTS) et (+KTS) d'une part, et la boite HMG de SRY d'autre part a été décrite. Elle semble induire l'activation de la transcription des gènes dont les promoteurs contiennent des sites de liaison pour SRY *in vitro* (Matsuzawa-Watanabe Y. *et al.*, 2003). Contrairement à la forme WT1(+KTS) qui nécessite des interactions protéine-protéine, la forme WT1(-KTS) intervient comme un facteur de transcription et régule un certain nombre de gènes impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelle.

Notamment, pendant la construction de la gonade bipotentielle, l'initiation de l'expression de Sf1 nécessite WT1(-KTS) (Fig.2). En effet, quatre sites de liaisons pour la protéine ont été localisés dans le promoteur de Sf1. De plus, l'expression de Sf1 n'a pas lieu dans les gonades de souris knock-out $Wt1^{-/-}$ (Wilhelm D. et Englert C., 2002).

### 4) Sf1 intervient dans la mise en place des tissus stéroïdogéniques

La protéine SF1 (Steroidogenic Factor 1) a d'abord été identifiée par sa capacité à reconnaître les motifs des éléments de réponse conservés dans les régions promotrices des enzymes stéroïdogéniques (Lala D.S. *et al.*, 1992). L'isolement de l'ADNc à partir d'une banque de surrénale de souris a montré son appartenance à la famille des récepteurs nucléaires et son homologie avec le gène Ftzf1 (fushi tarazu factor 1) de la drosophile, cloné en 1990 (Ueda H. *et al.*, 1990). Chez l'homme, Sf1 n'a été cloné qu'en 1996 (Wong M. *et al.*, 1996).

#### A) structure moléculaire

Le gène Sf1 code un récepteur nucléaire pour lequel on ne connaît pas encore de ligand clairement identifié, bien que les 25-, 26- ou 27- hydroxycholestérol aient un effet sur l'activation transcriptionnelle de SF1 (Lala D.S. *et al.*, 1997). La protéine SF1 possède les différents domaines fonctionnels communs aux membres de la famille des récepteurs nucléaires (Fig.4). Dans la partie N-terminale, on trouve un domaine de liaison à l'ADN avec deux doigts de zinc : le DBD (DNA Binding Domain). Le premier doigt de zinc contient une P-box (proximal box) qui intervient dans la reconnaissance spécifique des séquences des sites de liaison à l'ADN. A la suite du DBD, la boite A stabilise la liaison monomérique de SF1. Elle est suivie par une région charnière, un domaine de liaison au ligand (LBD : Ligand Binding Domain) et un domaine de transactivation AF2 dans la partie C-terminale. La région charnière et le domaine AF2 régulent l'activité transcriptionnelle de SF1. Pour ce faire, la région AF2 interagit avec des coactivateurs connus comme SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) et CBP/p300 (cAMPc responsive element Binding Protein) (Ito M. *et al.*, 1998).

La fonction moléculaire des protéines Ftz-F1 a été retrouvée, notamment, dans les régions DBD, LBD et AF2, chez des animaux aussi divergents que la drosophile et la souris : la protéine Ftz-f1 murine peut en effet restaurer le phénotype d'une drosophile mutante pour αFtz-f1 (Yussa M. *et al.*, 2001).

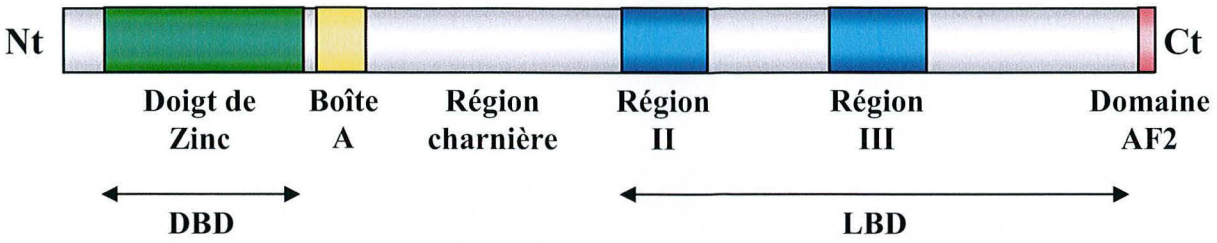



**Figure 4 :** Structure de la protéine SF1. La taille de la protéine varie selon les espèces et compte environ 460 acides aminés. Les différents domaines conservés sont représentés par des rectangles de couleurs différentes : le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est en vert, la boite A en jaune, les deux régions II et III en bleu et le domaine de transactivation AF2 en rose. Le domaine de liaison au ligand (LBD) situé dans la partie C-terminale est indiqué par une flèche (modifié, d'après Achermann J.C. *et al.*, 2001; Ozisik G. *et al.*, 2003).

Le gène Sf1 est localisé sur le chromosome 2 chez la souris et 9 chez l'homme (Taketo M. *et al.*, 1995). Il contient 7 exons chez les mammifères de même que chez le poulet (Kudo T. et Sutou S., 1999). Plusieurs transcrits sont codés par le gène Sf1. En effet, un deuxième homologue Fushi tarazu F1 a été isolé à partir de cellules de carcinome embryonnaire : Embryonal Long Terminal repeat-binding protein (ELP). L'ADNc de ELP est identique pour 1017 nucléotides avec l'ADNc de Sf1. L'homologie de séquence inclue le DBD et les deux transcrits diffèrent au niveau des extrémités 5' et 3'. Ils ont pour origine un gène unique et leur différence est due à l'usage de promoteurs et d'exons alternatifs (Ninomiya Y. *et al.*, 1995; Ikeda Y. *et al.*, 1993).

B) Rôle de Sf1

Comme Wt1, Sf1 joue d'abord un rôle essentiel dans la construction de la gonade indifférenciée. Sf1 est également détecté très tôt dans les crêtes génitales au cours du développement embryonnaire. Chez la souris, l'expression de Sf1 apparaît à 9 jpc, avant le début de l'expression de Sry (voir chapitre suivant) (Ikeda Y. *et al.*, 1994). Cette expression très précoce est également retrouvée chez le rat, l'homme, le porc, le poulet et la grenouille *Rana rugosa* (Hatano O. *et al.*, 1994; Hanley N.A. *et al.*, 1999; Pilon N. *et al.*, 1998; Smith C.A. *et al.*, 1999a; Kawano K. *et al.*, 1998).

Le rôle crucial de Sf1 dans la différenciation gonadique et la formation des tissus stéroïdogéniques primaires a été confirmé par l'inactivation de ce gène. La délétion du

gène Sf1 chez la souris, entraîne la mort 8 jours après la naissance. Ces animaux ne possèdent pas de surrénales ni de gonades et les canaux de Müller persistent chez les individus mâles (Luo X. *et al.*, 1994). En fait, chez ces souris knock-out, le développement gonadique est initié et la migration des cellules germinales se fait correctement. Cependant, par la suite, les gonades régressent par apoptose démontrant que Sf1 est nécessaire pour le maintien des cellules somatiques.

Chez l'homme, la première mutation du gène Sf1 a été rapportée en 1999. Ce patient présentait une inversion sexuelle XY avec des gonades à tubules séminifères immatures, une persistance des structures müllériennes et ne possédait pas de surrénales (Achermann J.C. *et al.*, 1999). Les analyses ont révélé une mutation hétérozygote dans la boîte P-box du DBD empêchant ainsi la protéine SF1 de se lier à l'ADN et d'activer les gènes cibles. Ces résultats indiquent le rôle important de Sf1 dans la différenciation sexuelle et la stéroïdogénèse.

L'activation du gène Sf1 n'est pas uniquement sous le contrôle de Wt1 (Fig.2). Le gène Lhx9 semble aussi être impliqué, un site de liaison pour LHX9 a en effet été identifié dans le promoteur de Sf1 (Wilhelm D. et Englert C., 2002). De plus, chez les souris $Lhx9^{-/-}$, Birk *et al.* (2000) ont montré que l'expression du gène Wt1 n'était pas affectée tandis que celle de Sf1 était réduite. Ainsi, la coopération entre Wt1 et Lhx9 pourrait conduire à l'activation complète de Sf1.

### 5) Formation des crêtes génitales

La prolifération des cellules à partir de l'épithélium cœlomique est un événement important dans la formation des crêtes génitales. La perte de fonction des gènes intervenant dans ce processus n'affecte que la gonade.

Lhx9 (LIM / Homeobox gene 9) code un facteur de transcription appartenant à la famille des gènes LIM. La protéine contient les mêmes domaines que la protéine LIM1. Chez la souris, Lhx9 est exprimé assez tôt dans les crêtes urogénitales. Les souris knock-out sont viables et, quel que soit le sexe génétique, les cellules somatiques des crêtes génitales ne prolifèrent pas et aucune gonade n'est formée bien que la migration des cellules germinales soit normale (Birk O.S. *et al.*, 2000). De plus, en l'absence de testostérone et d'hormone antimüllerienne (AMH), les individus génétiquement mâles différencient un tractus de type femelle. Dans les conditions normales, Lhx9 est exprimé dans les cellules en prolifération de l'épithélium coelomique dans les gonades mâles et femelles chez la souris (Birk O.S. *et al.*, 2000). Ces résultats sont comparables chez le rat

(Mazaud S. *et al.*, 2002) et le poulet (Oreal E. *et al.*, 2002). Chez les mâles, l'expression de Lhx9 diminue lors de la différenciation des cellules de Sertoli tandis qu'elle est maintenue à l'extérieur des tubes séminifères (Birk O.S. *et al.*, 2000; Oreal E. *et al.*, 2002; Mazaud S. *et al.*, 2002). Au cours de la différenciation femelle, Lhx9 n'est détecté que dans quelques follicules après l'éclosion chez le poulet (Oreal E. *et al.*, 2002). Chez le rat, Lhx9 est présent durant le développement ovarien fœtal mais disparaît lors de la formation des follicules (Mazaud S. *et al.*, 2002).

Pour le moment, chez l'homme, aucune mutation du gène Lhx9 n'a pu être mise en évidence chez des patients 46 XY présentant une agénésie ou dysgénésie gonadique (Ottolenghi C. *et al.*, 2001).

Chez la souris, la mutation d'un autre gène M33 entraîne un développement retardé des crêtes génitales : les gonades adultes ne sont pas totalement normales et les individus XY présentent différents degrés d'inversion sexuelle (Katoh-Fukui Y. *et al.*, 1998). M33 est un gène murin homologue au gène Polycomb de la drosophile. Il contient une structure particulière : le chromodomaine, qui a la particularité de se lier aux histones. La déficience de ce gène cause un retard de croissance gonadique qui se manifeste au même moment que l'expression du gène déterminant mâle Sry (voir chapitre suivant), suggérant que M33 induit l'inversion sexuelle en interférant avec les étapes qui surviennent en amont de Sry (Katoh-Fukui Y. *et al.*, 1998).

L'interaction entre la protéine GATA-4 et son cofacteur FOG-2 (Friend of GATA) est importante au cours de la différenciation gonadique puisque le knock-out de ces gènes chez une souris XY empêche le développement des cordons testiculaires (Tevosian S.G. *et al.*, 2002). En fait, GATA-4 et le cofacteur FOG-2 sont des gènes cruciaux qui agissent en amont du gène Sry. En effet, chez ces mutants, les gènes Sf1 et Wt1 sont normalement exprimés, alors que le niveau de transcrits Sry est diminué (Tevosian S.G. *et al.*, 2002).

Récemment, il a été montré que la voie de signalisation de l'insuline semble être exigée pour l'apparition des gonades mâles et leur différenciation sexuelle. En effet, des souris XY triples mutantes pour trois récepteurs à l'insuline, IR, IGF1R et IRR présentent un développement ovarien avec un phénotype femelle complet. De plus, l'expression du gène déterminant des mammifères Sry diminue démontrant que la voie de signalisation de l'insuline agit en amont de ce dernier et est nécessaire dans la voie mâle (Nef S. *et al.*, 2003).

# II) La détermination sexuelle

L'orientation de la gonade bipotentielle vers un testicule ou un ovaire est contrôlée par une cascade d'évènements moléculaires et cellulaires. Cette évolution de la différenciation gonadique vers l'un ou l'autre sexe peut être déterminée par des facteurs génétiques ou environnementaux. Chez certains vertébrés, le déterminisme est de type ESD (Environmental Sex Determination). De nombreux facteurs comme le pH, la force ionique, la densité de population ou la température influencent le devenir sexuel de l'embryon à un stade précis du développement. Chez ces espèces, aucun chromosome sexuel n'a été identifié. Au contraire, lorsque le phénotype sexuel est déterminé exclusivement par le génotype, le déterminisme est de type GSD (Genetic Sex Determination). C'est le cas par exemple chez les mammifères qui présentent une hétérogamétie mâle (XY) ou chez les oiseaux qui ont une hétérogamétie femelle (ZW).

## 1) Déterminisme génétique du sexe

Deux grands types de mécanismes dirigent la détermination génétique du sexe. Dans un premier cas, la présence ou l'absence d'un gène déterminant au niveau de la gonade bipotentielle oriente la différenciation sexuelle vers un sexe ou l'autre. Ces gènes concernés se situent en amont de la cascade génique et comme les mécanismes de détermination du sexe évoluent très vite, ces gènes sont peu conservés et ne concernent souvent qu'un groupe zoologique plus ou moins étendu. Dans l'autre cas, le dosage des gènes est important comme chez la drosophile ou le nématode *Caenorhabditis elegans*. Dans ce chapitre, nous ne détaillerons que quelques exemples parmi les mieux connus à l'heure actuelle.

### A) Le gène déterminant chez les mammifères : Sry

Chez les mammifères, la présence du chromosome Y conduit au développement mâle (Welshons W.J. et Russell L.B., 1959). La différenciation testiculaire chez les individus XY est induite par un locus dominant porté par le chromosome Y. Ce dernier a été nommé TDF (Testis Determining Factor) et semble comporter un ou plusieurs gènes qui interviennent dans la détermination mâle. L'analyse du génome de patients inversés sexuellement a conduit à l'isolement du gène SRY (Sinclair A.H. *et al.*, 1990). L'homologue Sry murin a été également cloné (Gubbay J. *et al.*, 1990).

*a) structure moléculaire*

Le gène Sry consiste en un exon unique. Il code un facteur de transcription qui contient un domaine de liaison à l'ADN : la boite HMG (High Mobility Group). Cette région de 80 acides aminés se lie de manière spécifique à l'ADN et y induit une courbure (Ferrari S. *et al.*, 1992). En fait, la protéine SRY est un facteur de transcription qui agit en influençant la structure de la chromatine dans les régions régulatrices des gènes cibles. Les protéines SRY humaine et murine reconnaissent des séquences ADN consensus spécifiques (Harley V.R. *et al.*, 1994; Nasrin N. *et al.*, 1991). Cependant, les deux protéines ont des propriétés de liaison distinctes et induisent des angles de courbure différents puisque la protéine SRY humaine est incapable de masculiniser les gonades d'une souris transgénique XX (Giese K. *et al.*, 1994).

Chez la souris, en plus de cette boite HMG, la protéine SRY est caractérisée par la présence d'une répétition d'un trinucléotide CAG dans la partie C-terminale (Gubbay J. *et al.*, 1992) (Fig.5). Ce domaine riche en glutamine fonctionne comme un activateur transcriptionnel (Dubin R.A. et Ostrer H., 1994). Il semble être essentiel pour la fonction de SRY dans la détermination sexuelle chez la souris. En effet, des souris transgéniques XX délétées pour ce domaine ne présentent pas d'inversion sexuelle (Bowles J. *et al.*, 1999) suggérant que les protéines SRY humaines et murines peuvent agir via des mécanismes biochimiques différents. Cependant ces résultats ne sont pas en accord avec les études de Lovell-Badge *et al.* (2002) qui montrent que la protéine SRY humaine peut induire une différenciation testiculaire chez une souris transgénique XX.

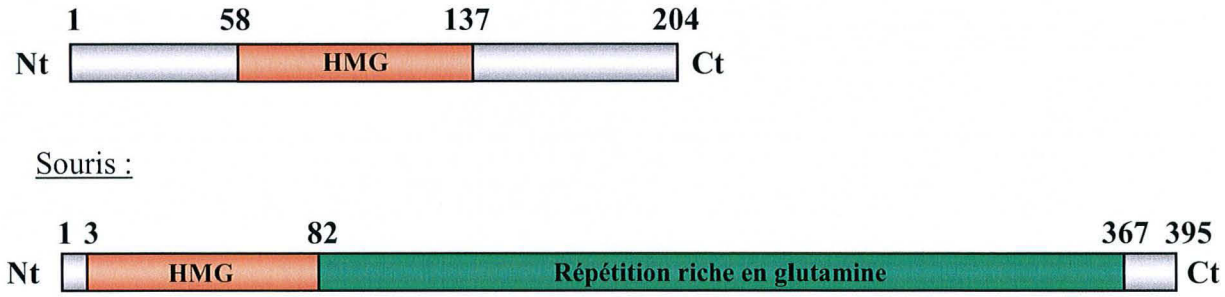



**Figure 5 : Comparaison entre les protéines SRY humaine et murine.** Le domaine HMG est représenté dans un cadre saumon. Le domaine supplémentaire riche en glutamine chez la souris est figuré dans un cadre vert (modifié, d'après Harley V.R. *et al.*, 2003a).

La protéine SRY humaine a été localisée au niveau du noyau dans deux lignées cellulaires NT2D1 et H8 (Poulat F. *et al.*, 1995). Deux signaux de localisation nucléaire (NLS) ont été identifiés de part et d'autre de la boite HMG (Sudbeck P. et Scherer G., 1997). Ces motifs NLS dans les parties N-terminale (nNLS) et C-terminale (cNLS) de la boite HMG peuvent agir indépendamment pour diriger le transport nucléaire. La caractérisation de ce transport a montré que cNLS interagit avec la protéine importine β1 (Impβ1) avec une haute affinité, mais pas avec la protéine importine α (Impα) (Forwood J.K. *et al.*, 2001). La partie nNLS n'est reconnue ni par Impβ1, ni par Impα. Cette dernière se lie à la calmoduline d'une manière $Ca^{2+}$ dépendante (Sweitzer T.D. et Hanover J.A., 1996; Harley V.R. *et al.*, 1996). Les deux signaux nNLS et cNLS sont hautement conservés et sont exigés pour une localisation nucléaire complète de la protéine SRY.

La protéine SRY ainsi que les protéines SOX (Sry box containing protein) joueraient également un rôle dans le processus d'épissage des ARN messagers. En effet, ces protéines sont colocalisées avec les facteurs d'épissage dans le noyau (Ohe K. *et al.*, 2002).

La protéine SRY est présente uniquement chez les mammifères sauf chez deux espèces de campagnol (Just W. *et al.*, 1995; Soullier S. *et al.*, 1998; Sutou S. *et al.*, 2001). A part le domaine de liaison à l'ADN, la protéine SRY est peu conservée chez les mammifères. Ce domaine montre une haute homologie avec les domaines HMG des protéines SOX (84% avec SOX3 et 76% avec SOX9). La faible conservation des séquences à l'extérieur de la boite HMG entre les espèces témoigne de l'évolution rapide de la protéine SRY (Whitfield L.S. *et al.*, 1993; Nagai K., 2001). La boîte HMG seule joue un rôle important puisque les boîtes HMG de Sox3 ou de Sox9 peuvent fonctionnellement se substituer à la boîte HMG de Sry pour initier la détermination sexuelle mâle (Bergstrom D.E. *et al.*, 2000).

*b) Rôle de Sry*

L'analyse de patientes XY présentant une dysgénésie gonadique a démontré le rôle essentiel de Sry dans le développement testiculaire. En effet, les mutations identifiées au niveau de ce gène sont impliquées dans le mécanisme d'inversion sexuelle chez ces individus (Berta P. *et al.*, 1990; Jager R.J. *et al.*, 1990). La plupart des mutations de ce gène ont été localisées à l'intérieur du domaine HMG affectant ainsi la capacité de la protéine SRY à se lier à l'ADN et à induire sa courbure (Cameron F.J. et Sinclair A.H.,

1997). Néanmoins, d'autres mutations ont été situées à l'extérieur de ce domaine HMG et conduisent aussi à des dysgénésies gonadiques. Celles-ci affectent l'interaction de la protéine SRY avec une protéine SIP1 qui contient un domaine PDZ, ainsi que les mécanismes d'import nucléaire (Poulat *et al.*, 1997 ; Tajima T. *et al.*, 1994; Harley V.R. *et al.*, 2003b; Li B. *et al.*, 2001).

L'implication du gène Sry dans l'initiation du développement mâle chez les mammifères a été confirmée par l'élaboration de souris transgéniques. L'introduction d'un fragment du chromosome Y contenant le gène Sry chez une femelle génétique est suffisante pour induire la différenciation d'un testicule normal (Koopman P. *et al.*, 1991). Chez la souris, Sry est exprimé uniquement durant les premières étapes de la différenciation testiculaire (Koopman P. *et al.*, 1990). En effet, l'expression commence juste après l'ébauche des crêtes génitales à 10,5 jpc et atteint son maximum à 11,5 jpc. Cette expression est maintenue jusqu'aux premiers signes de la différenciation testiculaire qui ont lieu vers 12,5 jpc puis décline jusqu'à disparaître complètement (Hacker A. *et al.*, 1995). Chez cette espèce, l'expression de Sry semble apparaître sous la forme d'une «vague dynamique» commençant au centre des crêtes génitales puis s'étendant jusqu'aux deux pôles (Bullejos M. et Koopman P., 2001; Albrecht K.H. et Eicher E.M., 2001). Chez l'homme, la protéine SRY est aussi détectée au moment de la détermination sexuelle, avec un pic d'expression au moment où les cordons sexuels sont visibles (Clepet C. *et al.*, 1993; Salas-Cortes L. *et al.*, 2001; Hanley N.A. *et al.*, 2000). Contrairement à la souris, son expression n'est pas transitoire, elle persiste jusqu'à l'âge adulte comme chez le mouton, le cochon, le wallaby et les espèces canines (Clepet C. *et al.*, 1993; Salas-Cortes L. *et al.*, 2001; Payen E. *et al.*, 1996; Harry J.L. *et al.*, 1995; Meyers-Wallen V.N., 2003). Ce profil d'expression laisse supposer que Sry a une fonction plus large que la seule détermination testiculaire.

B) Un gène déterminant chez les marsupiaux : Atry

ATRX (Alpha Thalassemia mental Retardation syndrome on the X) est un syndrome humain caractérisé par un retard mental sévère, une thalassémie alpha, une apparence faciale caractéristique et une inversion sexuelle de degré variable des individus XY. Ce gène est localisé sur le chromosome X et appartient à la superfamille des hélicases (Gibbons R.J. *et al.*, 1995; Ion A. *et al.*, 1996). Chez les mammifères euthériens, il semble agir en aval de Sry, Sox9 et l'AMH dans la voie mâle puisque des individus XY avec le syndrome ATRX présentent de petites gonades mâles sans canaux de Müller démontrant

que l'AMH est exprimée. Le développement de la gonade est interrompu avant l'organisation testiculaire mais après l'expression de Sry et la différenciation des cellules de Leydig et de Sertoli (Ion A. *et al.*, 1996). Chez la souris, le gène Atrx est aussi porté par le chromosome X comme chez les marsupiaux (Picketts D.J. *et al.*, 1998; Pask A. *et al.*, 2000). Cependant, contrairement aux mammifères euthériens, les marsupiaux possèdent un homologue sur le chromosome Y, Atry, exclusivement exprimé dans le testicule, alors que Atrx est absent du testicule en développement chez le wallaby (Pask A. *et al.*, 2000). Ainsi, Atry semble être un candidat plus probable que Sry pour la détermination mâle chez les marsupiaux : Atry présente en effet une expression testicule-spécifique au cours du développement alors que Sry est exprimé ubiquitairement (Harry J.L. *et al.*, 1995).

### C) Un gène déterminant chez les oiseaux : ASW (Avian Sex specific, W-linked)

Chez les oiseaux, la régulation de la détermination sexuelle n'est pas encore clairement tranchée entre l'intervention du dosage des gènes liés au chromosome Z ou la présence d'un gène déterminant sur le chromosome W (Ellegren H., 2001). La découverte d'un gène, ASW, lié au chromosome W ainsi que son expression femelle spécifique suggère un rôle important de ce chromosome dans la différenciation sexuelle (O'Neill M. *et al.*, 2000). En même temps, le même gène a été découvert par une autre équipe et nommé PKCIW (Hori T. *et al.*, 2000). Il code un inhibiteur de protéine kinase C et présente une haute homologie avec les protéines de la famille HIT (Histidine triad) qui contiennent un motif : His-X-His-X-His (X est un acide aminé hydrophobe). Le gène ASW est localisé sur le chromosome W sauf chez les ratites. Il existe également un homologue sur le chromosome Z (PKCIZ).

Le gène ASW est exprimé chez les embryons femelles mais pas chez les embryons mâles (O'Neill M. *et al.*, 2000). Il est détecté dans les crêtes génitales femelles avant le début de la différenciation sexuelle. L'expression est limitée aux crêtes urogénitales avec un haut niveau de transcrits dans les crêtes génitales par comparaison au mésonéphros. L'expression dans l'ovaire continue au cours du développement embryonnaire. Chez l'adulte, ASW est exprimé dans de nombreux tissus chez la femelle (Hori T. *et al.*, 2000).

ASW est le premier gène du chromosome W exprimé spécifiquement chez les femelles au cours du développement embryonnaire. La protéine ASW représente un candidat probable pour diriger la différenciation sexuelle chez les oiseaux.

D) DMY : un gène déterminant chez le poisson medaka

DMY, appartenant à la famille des gènes DM (*doublesex mab-3*) est un gène porté par le chromosome Y qui a été découvert chez le medaka. Il semble important pour le développement mâle puisque des mutations naturelles de ce gène conduisent à des inversions sexuelles complètes et fertiles.

*a) structure moléculaire*

Le gène DMY contient 6 exons et produit une protéine de 267 acides aminés (Fig.6). Cette protéine DMY présente une haute homologie avec la protéine DMRT1 (80% d'homologie). Ces protéines font partie de la même famille et contiennent un domaine DM de liaison à l'ADN.

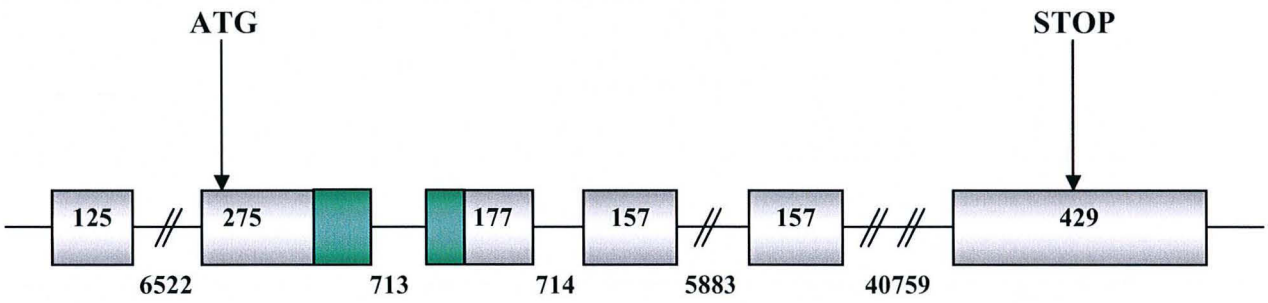



**Figure 6 : Structure génomique de DMY.** Les 6 exons sont représentés dans les cadres et sont séparés par les introns (traits). Les deux cadres figurés en vert indiquent le domaine DM. Les nombres de paires de bases sont indiqués, pour les exons dans les cadres et pour les introns en dessous du trait ( modifié d'après Matsuda M. *et al.*, 2002).

*b) Rôle de DMY*

DMY est exprimé durant le développement embryonnaire et larvaire mâle (Nanda I. *et al.*, 2002). La protéine DMY est détectée dans les embryons XY mais pas XX lorsque DMRT1, un gène intervenant dans la détermination et différenciation testiculaire chez les mammifères, n'est pas encore exprimé (Matsuda M. *et al.*, 2002). Chez l'adulte, DMY est exprimé dans les cellules de Sertoli (Nanda I. *et al.*, 2002).

Deux mutations naturelles de DMY ont permis d'établir son rôle critique dans le développement mâle (Matsuda M. *et al.*, 2002). Les premiers mutants nommés «Aware»

ont une protéine DMY tronquée (due à une insertion dans l'exon 3) et tous les individus XY sont femelles. Le deuxième mutant nommé «Shirone» conduit à une diminution de l'expression de DMY et une forte proportion des individus XY sont femelles.

Un gène DMRT1Y a également été isolé dans une région spécifique du chromosome Y (Nanda I. *et al.*, 2002). Il présente une identité nucléique de 96% avec le gène DMY cloné par Matsuda *et al.* (2002). Les différences observées sont expliquées par les différentes souches de medaka utilisées pour les analyses. Ce gène DMRT1Y correspond à une version dupliquée du gène autosomal Dmrt1 : ils présentent 90% de similarité au niveau protéique. La duplication générant DMY semble avoir eu lieu récemment au cours de l'évolution (Kondo M. *et al.*, 2003).

Néanmoins, l'analyse de nombreuses souches de medaka a mené à l'identification d'un nombre considérable de mâles fertiles ayant perdu ce gène DMY et présentant un phénotype normal. Ces individus sont génétiquement femelles (Nanda I. *et al.*, 2003). Donc, le gène DMY n'est pas toujours nécessaire pour le développement mâle, sa fonction peut être compensée par des «modificateurs autosomaux» non identifiés.

Ce gène déterminant mâle représente un équivalent de Sry chez les poissons. DMY a été identifié dans une région spécifique du chromosome Y (Matsuda M. *et al.*, 2002). Il est le seul gène fonctionnel de ce segment du chromosome Y et est localisé sur le locus déterminant sexuel mâle (Nanda I. *et al.*, 2002). Cependant, il est absent chez d'autres espèces de poissons étudiées comme *Xiphophorus maculatus*, le tilapia, le poisson zèbre et le guppy (Kondo M. *et al.*, 2003; Volff J.N. *et al.*, 2003; Veith A.M. *et al.*, 2003). Par conséquent, un rôle déterminant global de DMY est exclu chez les poissons. Il est actuellement décrit comme gène déterminant uniquement chez le medaka. Chez ce dernier, DMY représente une forme d'expression précoce de DMRT1, gène très conservé dans la fonction mâle, récemment recruté pour la détermination mâle.

### 2) La détermination sexuelle par l'environnement (ESD)

D'autres facteurs que la présence de chromosomes sexuels portant un gène dominant peuvent influencer le sexe de l'embryon. Ainsi, l'âge de l'animal, le pH, la salinité du milieu, la photopériode ou la densité de population peuvent diriger la différenciation sexuelle chez certains poissons (Baroiller J.F. et D'Cotta H., 2001). Le facteur environnemental le plus étudié influençant le devenir sexuel de l'embryon est la température. Ce mécanisme de détermination appelé TSD (Temperature Sex Determination) est essentiellement rencontré chez les reptiles ovipares. Les autres reptiles

comme les serpents et quelques lézards présentent un déterminisme génétique et possèdent des chromosomes sexuels héteromorphiques (Bull J.J., 1980). Un cas particulier a été exposé chez un lézard vivipare, *Eulamprus tympanum*, où aucun chromosome hétéromorphique n'a été détecté. Chez cette espèce, la température de gestation semble être importante puisque son augmentation conduit à une production de mâles (Robert K.A. et Thompson M.B., 2001). Chez les reptiles à TSD, la différenciation sexuelle des gonades est sensible à la température d'incubation des œufs durant une période critique du développement embryonnaire : la période thermosensible. Cet effet de la température a été rapporté par exemple chez le lézard *Agama agama*, chez les tortues *Emys orbicularis* et *Chelydra serpentina* et chez tous les crocodiles étudiés (Charnier M., 1966; Pieau C., 1971; Yntema C.L., 1976; Pieau C. *et al.*, 2001). Chez ces espèces, trois types de réponse à ce facteur ont été mis en évidence (Pieau C., 1996). Le premier type, nommé Ia, conduit à une descendance 100% mâle à température basse et 100% femelle à température élevée. A une température pivot, on obtient 50% d'individus de chaque sexe. Le deuxième type, Ib, donne l'inverse c'est à dire des femelles à température basse et des mâles à température élevée. Le dernier type, II, est un mode «femelle – mâle – femelle». Les femelles sont obtenues à températures basses et élevées tandis que les mâles sont générés par une température intermédiaire (Fig.7).

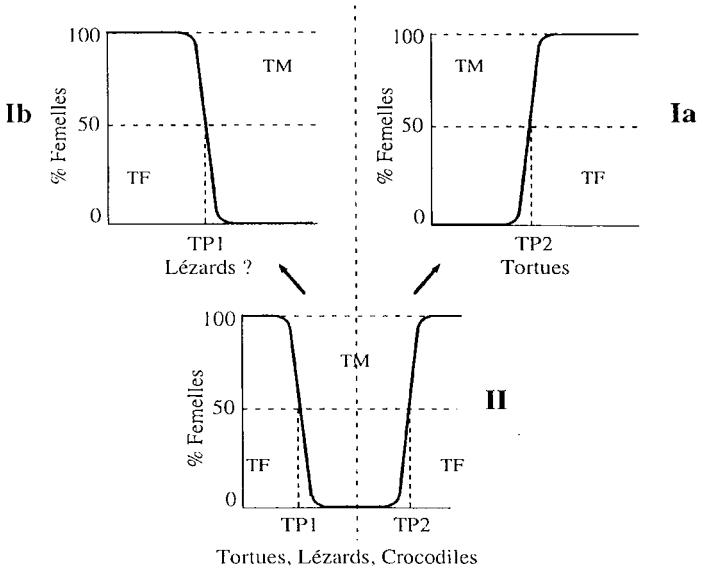



**Figure 7 : Schéma représentant les trois types de réponse à la température.** Le mode mâle-femelle **Ia** rencontré chez la plupart des tortues, donne des mâles à basse température : température masculinisante (TM) et des femelles à haute température : température féminisante (TF). La sex-ratio est de 1:1 à une température pivot (TP). Le mode femelle-mâle **Ib** retrouvé chez quelques lézards est l'inverse du Ia. Le mode femelle-mâle-femelle **II** rencontré chez les deux groupes précédents et chez les crocodiles donne des mâles à une température intermédiaire et des femelles aux températures faibles et élevées (D'après Pieau C., 1996).

Un effet de la température sur la détermination du sexe se retrouve chez des espèces GSD comme chez certains poissons et amphibiens. Bien que ces espèces présentent un déterminisme génétique du sexe, la différenciation sexuelle peut être influencée par la température d'élevage. Ceci est le cas chez de nombreux poissons (Conover D.O. et Kynard B.E., 1981; Baroiller J.F. *et al.*, 1995; Wang L.H. et Tsai C.L., 2000; Koumoundouros G. *et al.*, 2002; Saillant E. *et al.*, 2002). Chez le tilapia *Oreochromis niloticus*, l'augmentation de la température d'élevage induit la masculinisation des femelles génétiques (Baroiller J.F. *et al.*, 1995). On observe aussi cet effet de la température chez certains amphibiens comme *Triturus cristatus* (Wallace H. et Wallace B.M.N., 2000). Chez cette espèce, les températures élevées conduisent à une sex-ratio déviée vers les mâles tandis que les températures basses conduisent à une féminisation (Wallace H. et Wallace B.M.N., 2000). Notre modèle *Pleurodeles waltl* présente un déterminisme génétique du sexe qui peut également être influencé par la température. En effet, dans les conditions d'élevage normales à 20°C, la sex-ratio est égale à 1. Cependant, l'augmentation de la température d'élevage à 32°C conduit à une inversion sexuelle fonctionnelle des femelles ZW et on obtient des néomâles ZW (Dournon C. et Houillon C., 1984). La température a un effet inverse chez une espèce très voisine : *Pleurodeles poireti.* Cette dernière présente également un déterminisme génétique de type ZZ/ZW mais des larves mâles ZZ peuvent se différencier en femelles fertiles si la température d'élevage est augmentée à 30°C (Dournon C. *et al.*, 1984).

## III) La différenciation sexuelle

D'après la théorie de Witschi, outre les cellules germinales, la gonade serait composée de deux tissus différents : le cortex dérivé de l'épithélium cœlomique et la medulla issue du blastème mésonéphrétique. Ceci est le cas chez la plupart des vertébrés sauf chez les cyclostomes et les poissons téléostéens où le blastème gonadique, dérivant de l'épithélium cœlomique seul, est homogène sans distinction cortex-medulla. Au cours de la différenciation gonadique mâle, le cortex régresse tandis que la medulla se développe et se différencie en cordons séminifères. Chez la femelle, au contraire, le cortex se développe et se différencie en structure ovarienne tandis que la médulla dégénère (Fig.8).

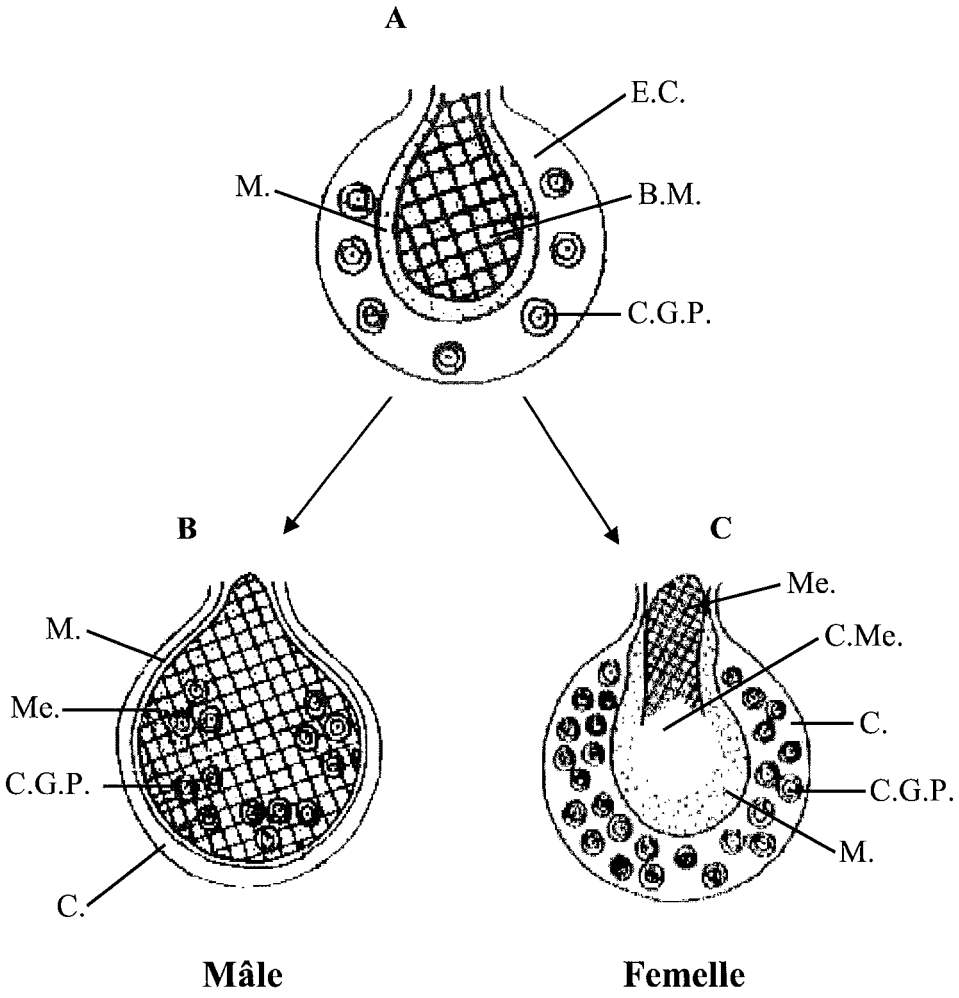



**Figure 8 :** Différenciation testiculaire et ovarienne. (A) Gonade indifférenciée avec l'épithélium cœlomique (E.C.), les cellules germinales primordiales (C.G.P.), le blastème mésonéphrétique (B.M.) et le mésenchyme (M.). (B) Différenciation testiculaire. La médulla se développe et les cellules germinales primordiales migrent du cortex (C.) vers la medulla (Me.). (C) Différenciation ovarienne. Le cortex se développe et la medulla dégénère conduisant à la formation d'une cavité médullaire (C.Me.) (modifié d'après Thibault C. *et al.*,1998).

La gonade possède deux types cellulaires, les cellules germinales et les cellules somatiques. Ces dernières sont classées en trois types. Les cellules précurseurs dites «de support» se différencient en cellules de Sertoli chez les mâles et en cellules de la granulosa chez les femelles. Le deuxième type correspond aux cellules stéroïdogènes qui donnent les cellules de Leydig chez les mâles et les cellules de la thèque ainsi que les cellules interstitielles chez la femelle. Enfin, les cellules précurseurs des tissus de connexion donnent le tissu vasculaire, la tunique et les cellules myoïdes péritubulaires chez les mâles et se différencient en tunique et cellules stromales chez les femelles.

Chez les mammifères, la différenciation sexuelle est principalement contrôlée par une cascade génique alors que chez les vertébrés non mammaliens, en plus de l'implication de certains gènes, les hormones sexuelles stéroïdes jouent aussi un rôle clé dans ce processus. Ainsi, dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons les principaux gènes participant au processus de la différenciation sexuelle. La plupart des gènes présentés dans ce paragraphe interviennent dans la différenciation testiculaire puisque peu de gènes impliqués dans le développement ovarien ont été mis en évidence à l'heure actuelle. Dans la deuxième partie, nous développerons l'importance des hormones sexuelles au cours de la différenciation gonadique chez les vertébrés non mammaliens.

## 1) Les différents gènes impliqués dans la différenciation sexuelle

Les gènes directement en aval de Sry ne sont pas encore connus, mais un certain nombre d'évènements cellulaires et morphologiques précoces ont été décrits au cours de la différenciation mâle.

### A) Induction de la prolifération cellulaire

Avant la découverte du gène Sry, la croissance différentielle gonadique était supposée déterminer le sexe : la gonade s'accroissant le plus rapidemment se différenciait en testicule alors que celle qui n'atteignait pas une certaine taille à un stade donné se développait en ovaire (Mittwoch U., 1986). Ce doublement de taille, spécifique des gonades XY, a été documenté chez de nombreuses espèces de mammifères (Hunt S.E. et Mittwoch U., 1987; Mittwoch U. *et al.*, 1969; Buehr M. et Petzoldt U., 1974; Mittwoch U. et Mahadevaiah S., 1980). Il a aussi été observé chez des reptiles TSD comme les tortues *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios H. *et al.*, 1997), *Emys orbicularis* (Pieau C. *et al.*, 1998) ou *Trachemys scripta* (Schmahl J. *et al.*, 2003), mais aussi chez l'alligator (Smith

C.A. et Joss J.M., 1994a).

Chez la souris, la prolifération cellulaire au sein de l'épithélium cœlomique des gonades XY est induite par le gène Sry. Cette augmentation de taille est observée pendant le pic d'expression de Sry au stade 11,25 jpc tandis qu'aucun changement n'est détecté dans les gonades XX (Schmahl J. *et al.*, 2000). Une période de prolifération critique de 8 heures a été définie entre 10,8 jpc et 11,2 jpc, coïncidant avec l'initiation de l'expression de Sry (Schmahl J. et Capel B., 2003). L'utilisation d'inhibiteurs de la prolifération sur des gonades en culture ou par injection intrapéritonéale à une souris en gestation, a montré que l'inhibition de la prolifération cellulaire avant ou après cette période critique conduit au développement de petits testicules avec un petit nombre de cordons testiculaires. De plus, lorsque l'inhibition a lieu pendant cette période, elle bloque la différenciation des cellules de Sertoli et diminue l'expression des gènes spécifiques du sexe mâle comme Sox9 et l'AMH. Par ailleurs, l'expression de gènes spécifiques du sexe femelle comme Dax-1 est observée dans des gonades XY en culture. Par conséquent, la prolifération n'est pas seulement nécessaire pour la différenciation mâle, mais elle est aussi impliquée dans l'inhibition de la voie femelle chez les embryons XY (Schmahl J. et Capel B., 2003). Chez la souris, cette multiplication cellulaire est le fait des cellules de Sertoli, tout comme chez l'alligator et la tortue *Trachemys scripta* (Schmahl J. *et al.*, 2000; Smith C.A. et Joss J.M., 1994a, Schmahl J. *et al.*, 2003). Elle semble conduire à l'augmentation du nombre de cellules précurseurs des cellules de Sertoli jusqu'à un niveau seuil, nécessaire pour diriger la détermination testiculaire. Ceci a déjà été montré chez l'homme, lors de la translocation du gène Sry sur un chromosome X inactivé. Dans ce cas, seules quelques cellules expriment Sry et ainsi, aucun testicule ne se développe en dépit de la présence d'un gène Sry fonctionnel (Kusz K. *et al.*, 1999). De même, l'analyse de chimères montre qu'il faut plus de 30% de cellules XY dans la gonade pour induire la différenciation testiculaire autrement la différenciation ovarienne est initiée (Burgoyne et Palmer, 1993).

### B) Migration des cellules du mésonephros et formation des cordons testiculaires

Chez la souris, après 11,5 jpc, les cellules mésonéphrétiques migrent dans la gonade mâle où elles vont contribuer à l'élaboration des cellules interstitielles. Cette migration cellulaire est critique pour la formation des cordons testiculaires puisque leur différenciation n'a pas lieu dans des cultures de gonades séparées du mésonéphros (Buehr M. *et al.*, 1993). La migration a lieu de 11,5 jpc à 16,5 jpc uniquement dans les gonades XY (Martineau J. *et al.*, 1997). Les cellules qui migrent sont à l'origine des cellules

péritubulaires myoïdes et des cellules endothéliales (Merchant-Larios H. *et al.*, 1993; Martineau J. *et al.*, 1997). Les cellules de Sertoli ne semblent pas dériver du mésonéphros mais apparaissent être issues de l'épithélium cœlomique (Karl J. et Capel B., 1998).

Ce phénomène migratoire spécifique du sexe mâle est dépendant de Sry : une souris XX possèdant un transgène Sry est inversée sexuellement et les cellules du mésonéphros migrent dans la gonade XX (Capel B. *et al.*, 1999). De même, dans les gonades XY inversées de la lignée de souris (C57BL/6J) possèdant des allèles faibles de Sry, la migration des cellules mésonéphrétiques ne s'effectue pas (Albrecht K.H. *et al.*, 2000). Néanmoins, lorsque l'on cultive une gonade XX prise en sandwich entre un mésonéphros et une gonade XY, les cellules mésonéphrétiques peuvent coloniser la gonade XX et y induire une organisation en cordons testiculaires avec l'expression des gènes spécifiques du sexe mâle (Tilmann C. et Capel B., 1999). Les gonades XY produisent un signal induisant la migration des cellules mésonéphrétiques.

Le facteur de croissance FGF9 semble participer à la migration des cellules du mésonéphros, à la stimulation de la prolifération des cellules mésenchymateuses et à la différenciation des cellules de Sertoli (Colvin J.S. *et al.*, 2001). L'inactivation du gène Fgf9 chez la souris entraîne en effet une inversion sexuelle des souris XY (Colvin J.S. *et al.*, 2001). Fgf9 semble agir en aval de Sry puisque son expression commence peu après celle de Sry (Colvin J.S. *et al.*, 2001).

La signalisation des PDGF (Platelet-Derived Growth Factors) est également un événement important en aval de Sry dans l'organogenèse du testicule. Le profil d'expression spatio-temporel des PDGF et de leur récepteur suggère qu'ils jouent un rôle dans le développement testiculaire (Gnessi L. *et al.*, 1995). L'inhibition de l'action des PDGF dans le testicule n'empêche pas la formation des cordons séminifères mais altère le développement normal du testicule (Uzumcu M. *et al.*, 2002). En effet, des souris knock-out pour Pdgf-A montrent une réduction progressive de la taille du testicule, une perte des cellules de Leydig et un arrêt de la spermatogenèse (Gnessi L. *et al.*, 2000). L'absence de Pdgfrα bloque la migration des cellules du mésonéphros et conduit à des défauts dans l'organisation des cordons testiculaires et du vaisseau cœlomique (Brennan J. *et al.*, 2003).

Sry, responsable de la migration des cellules endothéliales, contribue au développement du système artériel dans la gonade XY. La vascularisation du testicule diffère de celle de l'ovaire par la présence chez le mâle d'un gros vaisseau superficiel appelé vaisseau cœlomique. Cette vascularisation joue un rôle important dans l'export de la testostérone qui masculinisera l'embryon mâle (Brennan J. *et al.*, 2002).

Bien que le mésonéphros soit exigé pour la formation des cordons testiculaires, la différenciation des cellules de Sertoli et de Leydig peut avoir lieu en son absence au stade 11,5 jpc chez la souris (Merchant-Larios H. *et al.*, 1993).

C) La différenciation des cellules de Leydig

La signalisation PDGF est aussi impliquée dans la différenciation des cellules de Leydig (Brennan J. *et al.*, 2003). En effet, chez des souris Pdgf-$A^{-/-}$ comme Pdgfr$\alpha^{-/-}$, un défaut de développement des cellules de Leydig est observé (Brennan J. *et al.*, 2003; Gnessi L. *et al.*, 2000). De plus, le knock-out Pdgfr$\alpha^{-/-}$ conduit à une absence de l'expression d'un autre facteur critique : Dhh (Desert hedgehog). Dhh code une molécule de signalisation exprimée dans le testicule mais absente de l'ovaire (Bitgood M.J. *et al.*, 1996). Des souris $Dhh^{-/-}$ montrent des défauts dans la différenciation des cellules de Leydig fœtales, mais aucun effet sur la migration des cellules mésonéphrétiques n'est observé (Yao H.H. *et al.*, 2002). La signalisation Dhh agit sur la spécification de cette lignée en régulant l'expression de SF1 et du cytochrome P450 scc (P-450 side chain cleavage enzyme) dans les précurseurs des cellules de Leydig localisés à l'extérieur des cordons testiculaires (Yao H.H. *et al.*, 2002). Wnt4 (voir plus loin) intervient quant à lui dans la suppression de la formation de cellules de Leydig dans l'ovaire (Vainio S. *et al.*, 1999).

D) Induction de la différenciation des cellules de Sertoli

L'expression de Sry dans les cellules pré-Sertoliennes suggère qu'il est impliqué dans la différenciation de ces cellules (Rossi P. *et al.*, 1993; Albrecht K.H. et Eicher E.M., 2001). Par ailleurs, l'analyse de chimères indique que les cellules de Sertoli sont majoritairement XY (Burgoyne P.S. *et al.*, 1988; Palmer S.J. et Burgoyne P.S., 1991). Cependant, certaines cellules XX peuvent également se différencier en cellules de Sertoli (Palmer S.J. et Burgoyne P.S., 1991) suggérant qu'un facteur paracrine peut induire la différenciation testiculaire. Ainsi, la prostaglandine D2, a été supposée être ce facteur puisque l'ajout de cette molécule sur des crêtes génitales femelles en culture induit différents degrés de masculinisation. La présence de prospermatogonies dans les crêtes génitales suggère que les cellules de support femelles se sont différenciées en cellules de Sertoli (Adams I.R. et McLaren A., 2002). La synthèse d'AMH est le premier signe de cette différenciation. Son expression apparaît juste après le début de l'expression de Sry (Munsterberg A. et Lovell-Badge R., 1991). La protéine SRY active une voie régulatrice

qui conduit à l'expression de l'AMH puisque lorsqu'elle est mutée, l'induction de la transcription de cette hormone antimüllerienne échoue (Haqq C.M. *et al.*, 1994). Le moment où survient l'expression de Sox9 et la spécificité cellulaire de cette expression suggèrent qu'il soit régulé par Sry. En effet, tous deux sont exprimés dans les cellules de Sertoli et l'augmentation de l'expression de Sox9 est détectée juste après celle de Sry (Kent J. *et al.*, 1996; De Santa Barbara P. *et al.*, 2000; Hanley N.A. *et al.*, 2000). Sox9 semble être impliqué dans l'initiation et le maintien de la différenciation des cellules de Sertoli (Fig.9).

E) Le gène Sox9

Sox9 a été identifié chez l'homme comme un gène impliqué dans la formation osseuse et le contrôle du développement testiculaire. En effet, des translocations ou des mutations affectant ce gène provoquent le syndrome de la dysplasie campomélique (CD). Cette maladie est caractérisée par des malformations squelettiques et des défauts de formation du cartilage (Foster J.W. *et al.*, 1994; Wagner T. *et al.*, 1994). De plus, une inversion sexuelle est observée chez 75% des patients XY atteints de CD (Tommerup N. *et al.*, 1993; Houston C.S. *et al.*, 1983). Cette maladie est dûe à la perte de la fonction d'une copie du gène Sox9 (haploinsuffisance). En effet, une dose supplémentaire de Sox9 suffit à initier la différenciation testiculaire en l'absence de Sry puisqu'une duplication d'une région contenant Sox9 chez l'homme conduit à une inversion sexuelle (Huang B. *et al.*, 1999). Certains cas de dysplasie campomélique non associés à des inversions sexuelles peuvent être expliqués par des mutations affectant la capacité de Sox9 à se dimériser. Effectivement, Sox9 contient un domaine de dimérisation qui est nécessaire pour sa liaison dans la région régulatrice des gènes impliqués dans la chondrogenèse mais pas pour la détermination sexuelle où il agit en monomère (Bernard P. *et al.*, 2003).

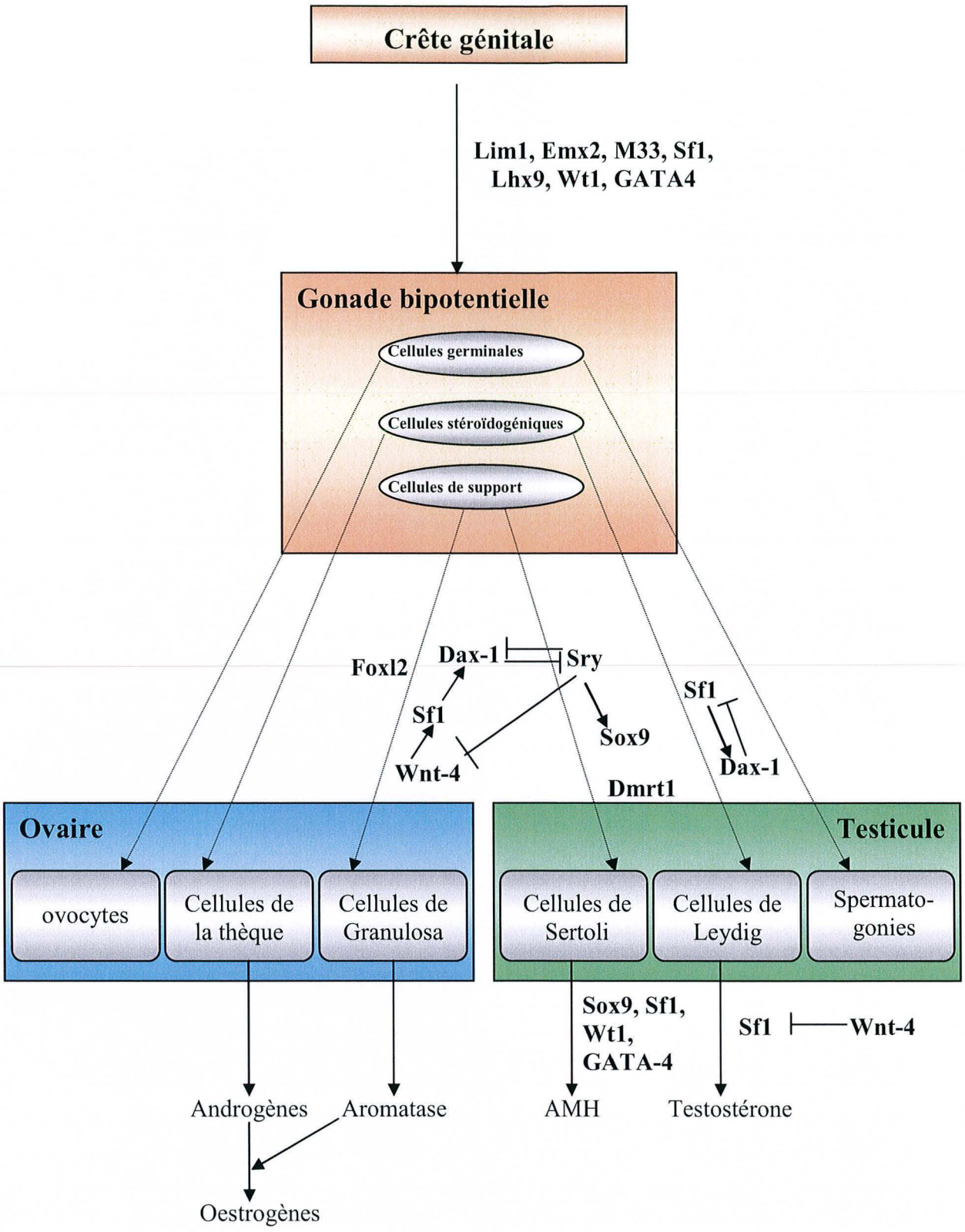



**Figure 9 : Synthèse des différents gènes intervenant dans la différenciation gonadique.** Les différentes interactions entre les gènes sont représentés par des flèches pour une activation et une flèche avec un trait à l'extrémité pour une inhibition (Modifié d'après Vaiman et Pailhoux, 2000).

*a) structure moléculaire*

Le gène Sox9, localisé sur les chromosomes 17 et 11 chez l'homme et la souris respectivement, contient trois exons (Fig.10) (Foster J.W. *et al.*, 1994; Wagner T. *et al.*, 1994; Wright E. *et al.*, 1995). Un seul gène Sox9 a été identifié chez les mammifères, ce qui est différent des poissons et des amphibiens. En effet, chez la grenouille *Rana rugosa*, deux gènes Sox9 ont été isolés : Sox9α et Sox9β. Sox9β, correspondant à une forme tronquée de Sox9α, a perdu 265 acides aminés dans la partie N-terminale dont la boite HMG (Takase M. *et al.*, 2000). Chez le poisson zèbre, deux gènes Sox9 issus d'un événement de duplication ont été isolés : Sox9a et Sox9b (Chiang E.F. *et al.*, 2001a). Sox9b est plus court du côté C-terminal. Sox9a a retenu sa fonction testiculaire tandis que Sox9b semble avoir acquis une nouvelle fonction associée au développement des crêtes neurales (Li M. *et al.*, 2002). Le gène Sox9a est également dupliqué chez l'anguille *Monopterus albus*, conduisant aux gènes Sox9a1 et Sox9a2 qui jouent un rôle dans la différenciation gonadique chez ce poisson (Zhou R. *et al.*, 2003). Chez le medaka, une forme de Sox9 plus longue de 78 acides aminés a été identifiée : Sox9lf. Ce gène contient un exon 1 et un intron 1 supplémentaires (Yokoi H. *et al.*, 2002). Au cours du développement, Sox9lf est fortement exprimé dans l'ovaire et faiblement dans le testicule (Yokoi H. *et al.*, 2002).

La protéine SOX9 est composée de 509 acides aminés chez l'homme. Comme la protéine SRY, SOX9 est un facteur de transcription qui contient une boîte HMG se liant spécifiquement à l'ADN (Ng L.J. *et al.*, 1997). La boîte HMG de SOX9 présente 70% d'homologie avec celle de SRY.

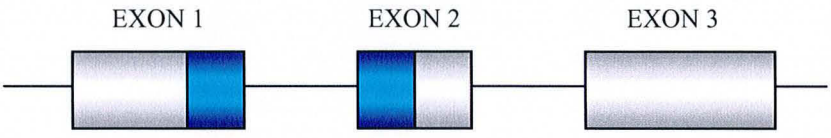



**Figure 10 : Organisation génomique du gène Sox9 humain.** Les trois exons sont représentés dans les cadres gris et le trait correspond aux introns. Le domaine HMG est représenté dans deux cadres bleus séparés par le premier intron (modifié, d'après Foster J.W. *et al.*, 1994).

SOX9, comme la protéine SRY est nucléaire. Les séquences de localisation nucléaire nNLS et cNLS, de part et d'autre de la boîte HMG, sont hautement conservées à travers la famille de protéines SOX, ce qui implique une conservation du mécanisme d'import nucléaire (Fig.11) (Sudbeck P. et Scherer G., 1997). En effet, SOX9 interagit comme SRY avec l'importine β via son domaine cNLS et avec la calmoduline, d'une manière calcium dépendante, via son domaine nNLS (Preiss S. *et al.*, 2001; Argentaro A. *et al.*, 2003).

Toutefois, la protéine SOX9 contient des domaines additionnels par rapport à SRY. Deux domaines de transactivation ont été observés dans la partie C-terminale de la protéine (Fig.11). Le domaine PQA, composé de 41 acides aminés chez l'homme, est riche en proline, glutamine et alanine (Wagner T. *et al.*, 1994). Le domaine PQS est riche en proline, glutamine et serine (Sudbeck P. *et al.*, 1996). Le domaine PQA de SOX9 varie légèrement en longueur et en séquence selon les espèces tandis que le domaine PQS est très hautement conservé (Sudbeck P. *et al.*, 1996; Ng L.J. *et al.*, 1997). Ces deux domaines PQA et PQS interagissent avec d'autres protéines pour induire la transactivation. La plus grande activité de transactivation est conférée au domaine PQS. Cependant, PQA est nécessaire pour obtenir une transactivation maximale (McDowall S. *et al.*, 1999).

La protéine SOX9 humaine contient également un signal d'export nucléaire (NES) (Fig.11). Il est localisé entre les deux NLS, dans la boîte HMG (acides aminés 134-147). Cette courte séquence hydrophobe riche en résidus leucine est conservée parmi les autres protéines SOX9 chez les mammifères. Cette séquence NES est fonctionnelle puisque la mutation d'une leucine (142A) bloque l'export nucléaire de SOX9 et la protéine devient constitutivement nucléaire. Ceci entraîne l'inversion sexuelle de gonades XX en culture démontrant que ce système d'export joue un rôle «anti-mâle» durant la différenciation gonadique femelle en gardant SOX9 à l'extérieur du noyau (Gasca S. *et al.*, 2002).

Enfin, un domaine de liaison pour la protéine HSP70 est conservé parmi les protéines SOX appartenant au groupe E (Wegner M., 1999). Effectivement, une interaction entre ces deux protéines a été mise en évidence dans des lignées cellulaires chondrocytaires et testiculaires. Elle implique la partie C-terminale de la protéine HSP70 avec les 100 acides aminés situés entre la boîte HMG et le domaine PQA de la protéine SOX9 (acides aminés 236-332) (Marshall O.J. et Harley V.R., 2001).

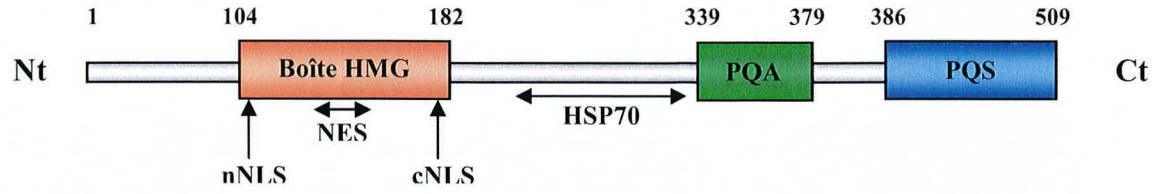



**Figure 11 : Structure de la protéine SOX9 humaine.** La protéine compte 509 acides aminés. Les différents domaines sont représentés par des rectangles de couleurs différentes. La boîte HMG dans un cadre saumon est localisée dans la partie N-terminale. Les signaux de localisation nucléaire nNLS et cNLS sont de part et d'autre du domaine HMG. Le signal d'export nucléaire (NES) est localisé au centre de la boite HMG (acides aminés 134-147). Les domaines de transactivation PQA et PQS sont situés dans la partie C-terminale. Le domaine d'interaction avec la protéine HSP70 est indiqué par une flèche (modifié, d'après McDowall S. *et al.*, 1999).

*b) Rôle de Sox9*

Les analyses de mutations, de translocations de ce gène chez l'homme ainsi que les études d'expression ont montré que Sox9 intervenait au cours de la différenciation mâle. Effectivement, l'expression du gène Sox9 est sexuellement dimorphique, associée au développement testiculaire. Chez la souris, Sox9 est détecté dans les crêtes génitales des deux sexes à faible niveau. Puis, au stade 11,5 jpc, le niveau de transcrits augmente dans les gonades mâles tandis qu'il diminue chez les femelles (Morais da Silva S. *et al.*, 1996; Kent J. *et al.*, 1996). Ce profil d'expression est également observée chez la chèvre (Pailhoux E. *et al.*, 2002), le porc (Parma P. *et al.*, 1999), le poulet (Kent J. *et al.*, 1996) mais aussi chez les espèces TSD, comme les tortues *Trachemys scripta* et *Lepidochelys olivacea* (Spotila L.D. *et al.*, 1998; Moreno-Mendoza N. *et al.*, 1999). Dans les gonades d'alligator, l'expression de Sox9 augmente à la fin de la TSP à température masculinisante (33°C) tandis qu'à température féminisante (30°C et 34,5°C), l'expression de Sox9 reste à un bas niveau (Western P.S. *et al.*, 1999a). Le rôle de Sox9 dans la différenciation testiculaire a été confirmé par des expériences de greffe chez la souris. En effet, la greffe d'un ovaire fœtal sous une capsule rénale de mâle adulte montre que l'inversion sexuelle de ce greffon en testicule s'accompagne d'une forte expression de Sox9 (Morais da Silva S. *et al.*, 1996).

Chez des souris transgéniques, l'expression ectopique du gène Sox9 sous le contrôle de la région régulatrice de WT1 a montré qu'à lui seul, ce gène peut diriger la

détermination mâle et ainsi se substituer au gène Sry (Vidal V.P. *et al.*, 2001). De même, la duplication d'une région contenant Sox9 chez l'homme conduit à des inversions sexuelles par une activation ectopique du gène Sox9 dans les gonades XX (Huang B. *et al.*, 1999). Cependant, ce rôle déterminant testiculaire précoce pour Sox9 n'est pas aussi clair chez tous les vertébrés. Chez le rongeur *Ellobius lutescens*, une espèce dont le chromosome Y a été perdu, la détermination mâle peut se mettre en place en l'absence de Sox9 impliquant que Sox9 n'est pas le déterminant testiculaire chez cette espèce (Baumstark A. *et al.*, 2001). De même, chez l'alligator et le lézard *Eublepharis macularius*, l'expression sexe spécifique de Sox9 n'est détectée qu'au moment où le sexe est irréversiblement déterminé (Western P.S. *et al.*, 1999a; Valleley E.M. *et al.*, 2001). Sox9 est également impliqué dans la différenciation testiculaire chez le wallaby mais les transcrits sont aussi retrouvés dans le scrotum et les glandes mammaires en développement ainsi que dans l'épithélium des canaux de Wolff ce qui suggère un rôle plus large de Sox9 dans la différenciation du système reproducteur (Pask A.J. *et al.*, 2002).

*c) Régulation de la transcription du gène Sox9*

Chez la souris, une région de 120 pb identifiée dans le promoteur de Sox9 est responsable de son haut niveau d'expression dans le testicule. Elle contient des sites de liaisons pour la protéine SRY et/ou d'autres protéines SOX (Kanai Y. et Koopman P., 1999). L'analyse comparative de la région promotrice du gène Sox9 de l'homme, de la souris et du fugu a montré l'existence de sites de liaison conservés pour les protéines SOX et WT1 (Bagheri-Fam S. *et al.*, 2001). Sox9 lui même pourrait se lier sur ces sites et donc jouer un rôle d'autorégulateur. D'autres protéines SOX comme SOX8 ou SOX10 pourraient aussi être impliquées dans cette régulation (Schepers G. *et al.*, 2003; Takada S. et Koopman P., 2003).

L'injection d'un transgène Dct-tyrosinase chez des souris XX a entraîné le développement d'individus présentant une microphtalmie et une inversion sexuelle. Le phénotype mutant a été appelé Odsex (Ocular degeneration with sex reversal). L'insertion a causé une délétion d'environ 150 kb localisée 1 Mb en amont du gène Sox9, et conduit au développement de souris XX en mâles stériles (Bishop C.E. *et al.*, 2000). Chez les individus XX Ods/+, les gonades fœtales maintiennent l'expression de Sox9 et l'hormone antimüllerienne est correctement exprimée. Donc, la région délétée doit contenir des éléments régulateurs impliqués dans la répression de l'expression de Sox9 au niveau des gonades femelles. Puisque cette délétion ne conduit pas à des malformations squelettiques,

elle ne doit toucher qu'une région régulatrice spécifique des gonades. D'autres études ont déjà montré que les éléments régulateurs du gène Sox9 couvrent une large région en amont du gène (Wunderle V.M. *et al.*, 1998; Pfeifer D. *et al.*, 1999). Un locus impliqué dans l'extinction de l'expression de Sox9 dans les gonades femelles a été identifié chez la souris et nommé Odsm1. Il est localisé sur le chromosome 18 (Qin Y. *et al.*, 2003).

*d) Gènes cibles de Sox9*

La protéine SOX9 contribue à l'activation de la transcription de deux gènes intervenant dans la différenciation gonadique : Sf1 et Amh (voir chapitre suivant). En effet, deux sites de liaison pour des protéines SOX, dont un décisif, ont été identifiés au niveau du promoteur de Sf1. SOX9 semble être le candidat le plus probable pour l'activation de la transcription du gène Sf1 puisque l'augmentation de l'expression de Sf1 a lieu après le début d'expression de Sox9 (Nomura M. *et al.*, 1995; Shen J.H. et Ingraham H.A., 2002). Récemment, deux sites de liaison pour la protéine SOX9 ont été trouvés au niveau du promoteur d'un gène humain KIAA0800. Sox9 augmente la transcription de ce gène qui présente une expression spécifique du testicule. KIAA0800 est hautement conservé : des gènes homologues existent chez la souris, la drosophile et *Caenorhabditis elegans* mais pas chez les organismes unicellulaires (Zhao L.J. *et al.*, 2002). Cependant, sa fonction est encore inconnue.

F) Le gène Sf1

En plus de son implication dans la construction de la gonade indifférenciée, Sf1 joue un rôle dans l'activation de la différenciation sexuelle.

Chez la souris, l'expression de Sf1 devient différentielle dès que les gonades en développement commencent à se différencier : elle augmente au cours de la différenciation mâle tandis qu'elle diminue dans les gonades femelles (Ikeda Y. *et al.*, 1994). Ceci est également le cas chez le rat, l'homme, le porc (Hatano O. *et al.*, 1994; Hanley N.A. *et al.*, 1999; Pilon N. *et al.*, 1998). Ce profil d'expression spécifique du sexe mâle est également observé chez une espèce TSD, la tortue *Trachemys scripta* où l'expression de Sf1 augmente à température masculinisante (26°C) et diminue à température féminisante (31°C) dès que le sexe des gonades devient identifiable en histologie (Fleming A. *et al.*, 1999). Cependant, chez certaines espèces, Sf1 est impliqué dans la différenciation ovarienne. Ainsi, le niveau de transcrits Sf1 est plus important au cours de la

différenciation femelle chez le poulet (Smith C.A. *et al.*, 1999a), la grenouille *Rana catesbeiana* (Mayer L.P. *et al.*, 2002) et l'alligator (Western P.S. *et al.*, 2000). Chez le wallaby, Sf1 ne semble pas impliqué dans la différenciation sexuelle puisqu'il est exprimé de façon similaire chez les individus mâles et femelles avant et pendant la différenciation gonadique (Whitworth D.J. *et al.*, 2001).

L'expression élevée de Sf1 apparaît être corrélée avec le sexe qui présente une activité stéroïdogénique plus importante. Effectivement, il a été montré chez les embryons de poulet que l'ovaire est plus steroïdogéniquement actif que le testicule (Guichard A. *et al.*, 1979). Notamment, l'activité aromatase est 100 fois plus importante dans l'ovaire à des stades précoces du développement (Imataka H. *et al.*, 1988). A l'inverse chez les mammifères, le testicule est stéroïdogéniquement plus actif que l'ovaire au début du développement (Jost A., 1970).

Chez les espèces TSD, la régulation de l'expression de Sf1 semble être modulée par la température d'incubation et le contenu en œstrogènes des embryons en développement (Fleming A. et Crews D., 2001). En effet, chez la tortue *Trachemys scripta*, le traitement par des œstrogènes conduit au développement femelle après la diminution de l'expression de Sf1. A l'inverse, le traitement avec un inhibiteur de l'aromatase conduit à l'augmentation de l'expression de Sf1 et à un développement mâle (Fleming A. et Crews D., 2001; Crews D. *et al.*, 2001). Chez la grenouille *Rana catesbeiana*, l'exposition des larves à un polluant industriel, un xéno-œstrogène (octylphénol), pendant 24 heures accélère la différenciation gonadique des individus mâles et femelles et altère l'expression sexuelle dimorphique de Sf1 (Mayer L.P. *et al.*, 2003).

### G) Le gène Dmrt1

Dmrt1 est l'élément le plus conservé dans la cascade génique de la différenciation sexuelle. Il joue un rôle critique dans la différenciation testiculaire chez les vertébrés.

#### *a) structure moléculaire*

Le gène Dmrt1 contient 5 exons (Ottolenghi C. *et al.*, 2002) et code un facteur de transcription contenant un motif de liaison à l'ADN : le domaine DM (Fig.12) (Raymond C.S. *et al.*, 1998). Un domaine riche en proline et sérine, nommé domaine P/S, est situé du côté C-terminal de la protéine (Brunner B. *et al.*, 2001). DMRT1 présente une similarité de séquence avec la protéine DSX-M de la drosophile et la protéine MAB-3 du nématode

aussi chez *Acropora millepora* (Raymond C.S. *et al.*, 1998; Miller S.W. *et al.*, 2003). Chez les vertébrés, Dmrt1 montre une expression spécifique des gonades mâles des poissons à l'homme (Brunner B. *et al.*, 2001).

Chez la souris, Dmrt1 est détecté à des stades précoces du développement embryonnaire dès 9,5 jpc, dans les crêtes génitales mâles et femelles (Raymond C.S. *et al.*, 1999b). A des stades plus tardifs de la différenciation sexuelle, son expression n'est maintenue que dans les gonades XY (Raymond C.S. *et al.*, 1999b; De Grandi A. *et al.*, 2000). L'analyse de souris knock-out Dmrt1$^{-/-}$ démontre que ce gène est impliqué dans la différenciation testiculaire. Effectivement, alors que les femelles sont normales et fertiles, les souris mâles Dmrt1$^{-/-}$ présentent des défauts sévères au niveau du testicule : absence de cellules germinales et cellules de Sertoli non différenciées (Raymond C.S. *et al.*, 2000). Ceci suggère pour Dmrt1 un rôle dans la différenciation des cellules de Sertoli, la formation des tubes séminifères et la spermatogenèse (Raymond C.S. *et al.*, 2000).

L'implication de Dmrt1 dans la différenciation testiculaire a également été décrite chez les poissons (Marchand O. *et al.*, 2000; Guan G. *et al.*, 2000). Chez le poisson hermaphrodite *Acanthopagrus schlegeli*, le niveau d'expression de Dmrt1 est corrélé avec le changement de sexe (He C.L. *et al.*, 2003). Cette espèce est hermaphrodite protandre : les mâles sont fonctionnels pendant deux ans, puis une inversion sexuelle a lieu lors de la troisième année. Chez la grenouille *Rana rugosa*, l'expression testicule spécifique n'est détectée qu'après la métamorphose, aucun signal n'est observé dans les gonades indifférenciées ou dans l'ovaire (Shibata K. *et al.*, 2002). Chez cette espèce, le traitement de gonades XX par de la testostérone entraîne une inversion sexuelle accompagnée de l'expression de Dmrt1 suggérant qu'il est également impliqué dans la différenciation testiculaire chez les amphibiens (Shibata K. *et al.*, 2002). Il en est de même chez le lézard *Calotes versicolor*, où Dmrt1, effecteur de la différenciation mâle, active la prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli (Sreenivasulu K. *et al.*, 2002).

Chez d'autres espèces, Dmrt1 semble intervenir plus précocement au cours de la détermination sexuelle mâle. Chez le poulet, Dmrt1 est exprimé dans les crêtes génitales des embryons mâles et femelles avant l'approche de la différenciation sexuelle, puis, son expression devient plus importante dans les gonades ZZ (Raymond C.S. *et al.*, 1999b; Smith C.A. *et al.*, 1999b). Le gène Dmrt1 a été localisé sur le chromosome Z du poulet suggérant que le haut niveau d'expression de Dmrt1 chez les individus mâles pourrait refléter la présence de deux copies de ce gène lié au Z (Nanda I. *et al.*, 1999). Cependant, l'induction de l'inversion sexuelle de femelles génétiques par un inhibiteur de l'aromatase

a montré un haut niveau d'expression de Dmrt1 indiquant que cette expression ne reflète pas une différence de dosage entre les deux sexes mais une implication active dans le développement mâle (Smith C.A. *et al.*, 2003). Chez l'homme, Dmrt1 est aussi exprimé au moment de la détermination sexuelle, en même temps que SRY dans la gonade XY alors qu'aucun transcrit n'est détecté dans l'embryon XX à cette période (Moniot B. *et al.*, 2000). Chez les reptiles TSD, Dmrt1 représente le premier gène différentiellement exprimé avant l'approche de la différenciation sexuelle. Chez les tortues *Trachemys scripta* et *Lepidochelys olivacea* ainsi que chez l'alligator, l'augmentation de l'expression de Dmrt1 à température masculinisante précède l'expression de Sox9 dans les embryons mâles (Smith C.A. *et al.*, 1999b; Kettlewell J.R. *et al.*, 2000; Torres Maldonado L.C. *et al.*, 2002; Murdock C. et Wibbels T., 2003a).

Dans le testicule adulte, Dmrt1 est principalement exprimé dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales (Raymond C.S. *et al.*, 1999b; Smith C.A. *et al.*, 2003; Aoyama S. *et al.*, 2003; Pask A.J. *et al.*, 2003). Chez les femelles adultes, Dmrt1 a aussi été détecté dans l'ovaire de la souris et du wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2003), du poulet (Smith C.A. *et al.*, 2003), de la truite (Marchand O. *et al.*, 2000) suggérant que Dmrt1 joue aussi un rôle tardif dans la fonction ovarienne. Dans l'ovaire adulte de la souris et du wallaby, la protéine Dmrt1 est localisée dans les cellules de la granulosa et les cellules germinales suggérant qu'il est impliqué dans la folliculogenèse et la maturation ovocytaire (Pask A.J. *et al.*, 2003). Chez le lézard *Calotes versicolor*, Dmrt1 est aussi détecté dans les cellules germinales de l'ovaire en développement, suggérant qu'il intervient dans la gamétogenèse en activant la prolifération des cellules germinales à la fois dans l'ovaire et le testicule (Sreenivasulu K. *et al.*, 2002).

### H) Les autres gènes de la différenciation mâle

L'analyse de banques de cDNA enrichies en transcrits spécifiques mâles ou femelles, réalisées par hybridation soustractive ou differential display à l'approche de la différenciation sexuelle chez la souris, a permis d'isoler de nombreux gènes. Le gène Maestro (Male specific transcription in the developing reproductive organs) qui code une protéine nucléaire contenant des répétitions HEAT-like, présente une expression spécifique mâle avant et après la différenciation testiculaire (Smith L. *et al.*, 2003). Le gène testatine, codant pour un inhibiteur de protéases, est détectable dès le stade 9,5 jpc dans les gonades mâles et femelles mais son expression n'est maintenue que chez les mâles (Tohonen V. *et al.*, 1998; Kanno Y. *et al.*, 1999). Deux autres gènes, nexine-1 et vanine-1, montrent une

expression mâle spécifique avant le début de la différenciation gonadique. Nexin-1 et vanin-1 codent respectivement pour un inhibiteur de protéase et une glycoprotéine de surface impliquée dans l'induction de la migration des cellules du thymus (Grimmond S. *et al.*, 2000; Bowles J. *et al.*, 2000).

Timp-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases) impliqué dans le remodelage de la matrice extracellulaire durant le développement gonadique présente une expression sexuellement dimorphique à partir de 12,5 jpc chez la souris : elle est restreinte aux cellules de Sertoli (Guyot R. *et al.*, 2003). L'expression différentielle «mâle spécifique» du collagène de type II et IX dans les cellules de Sertoli au cours du développement joue aussi un rôle dans la différenciation testiculaire et est régulée par Sox9 (McClive P.J. et Sinclair A.H., 2003).

I) SRY : un répresseur de la voie femelle

La protéine SRY semble aussi agir comme un répresseur de la voie femelle. Ainsi, un gène nommé «Z» a été envisagé comme inhibiteur des gènes mâles chez les femelles tandis que chez les individus mâles, SRY inhiberait «Z» directement ou indirectement et permettrait ainsi la différenciation testiculaire. Cette hypothèse permet d'expliquer les inversions sexuelles femelles XY en présence d'une protéine SRY normale où la surexpression du gène «Z» pourrait bloquer le développement mâle. L'hypothèse est aussi applicable aux patients XX mâles : ces individus porteraient une mutation récessive au niveau du gène «Z» autorisant l'expression des caractéristiques mâles en l'absence de la protéine SRY (McElreavey K. *et al.*, 1993).

Sox3, un gène localisé sur le chromosome X, a été supposé être le gène «Z» (Stevanovic M. *et al.*, 1993; Foster J.W. et Graves J.A., 1994). Il a été proposé que Sox3 pourrait bloquer l'action de Sry (Graves J.A., 1998). A l'inverse, Sox3 serait inhibé par SRY au cours du développement mâle. Cette hypothèse est confortée par la présence simultanée des transcrits Sox3 et Sry (Collignon J. *et al.*, 1996). Cependant, aucune mutation au niveau du gène Sox3 n'a été détectée chez des patients XX ou XY présentant une dysgénésie gonadique (Lim H.N. *et al.*, 2000). De même, chez des patients XY, des délétions de Sox3 causent un retard mental mais n'empêchent pas le développement sexuel mâle (Stevanovic M. *et al.*, 1993). Récemment, la délétion du gène Sox3 chez la souris n'a aboutit à aucune inversion sexuelle, démontrant qu'il n'était pas impliqué dans la détermination sexuelle (Weiss J. *et al.*, 2003). En outre, chez le poulet, Sox3 est détecté à haut niveau dans les gonades des deux sexes sans aucun dimorphisme (Smith C.A. *et al.*,

1999c). Chez les marsupiaux, Sox3 n'a conservé que son rôle dans le développement du système nerveux central, il n'est pas détecté pendant la période critique de la différenciation sexuelle (Pask A.J. *et al.*, 2000). Cependant, Sox3 pourrait avoir conservé son rôle dans la spermatogenèse comme chez la souris et l'homme, puisque son messager est présent dans le testicule adulte (Pask A.J. *et al.*, 2000). Il a été montré récemment chez des souris knock out $Sox3^{-/-}$ que ce gène est aussi important pour le développement des ovocytes, la différenciation testiculaire et la gamétogenèse (Weiss J. *et al.*, 2003).

Dax-1 a aussi été supposé être ce gène «Z». La découverte de ce gène est associée à l'identification chez l'homme d'inversions sexuelles chez des individus XY portant une duplication en tandem du bras court du chromosome X. Le locus responsable de cette inversion, nommé DSS (Dosage Sensitive Sex reversal), correspond à une région de 160kb qui jouerait un rôle au cours du développement ovarien (Bardoni B. *et al.*, 1994). La délétion de ce locus DSS n'affecte pas le développement testiculaire, mais cause une hypoplasie surrénalienne congénitale (AHC) et un hypogonadisme hypogonadotrope (HHG) (Muscatelli F. *et al.*, 1994). La recherche de gènes présents dans cette région du chromosome X a permis d'isoler le gène Dax-1 (DSS-AHC critical region on the X, gene1) (Zanaria E. *et al.*, 1994). Les mutations de Dax-1 sont responsables de l'AHC (Muscatelli F. *et al.*, 1994).

Dax-1 a été décrit comme un déterminant ovarien qui réprime le développement testiculaire. Les études d'expression chez la souris sont en accord avec un rôle de Dax-1 dans la détermination sexuelle. Chez la souris et l'homme, Dax-1 est détecté dans les crêtes génitales mâles et femelles en même temps que Sry avant de diminuer chez les embryons mâles (Swain A. *et al.*, 1996; Hanley N.A. *et al.*, 2000). De plus, des souris XY portant des copies supplémentaires de Dax-1 présentent une inversion sexuelle (Swain A. *et al.*, 1998). Néanmoins, la perte de la fonction de Dax-1 chez des souris femelles XX n'affecte pas le développement ovarien ni la fertilité (Yu R.N. *et al.*, 1998). Par conséquent, Dax-1 ne peut pas être un gène déterminant ovarien en dépit de son action antagoniste sur SRY. Il semble plutôt jouer un rôle critique dans la spermatogenèse puisque le knock-out $Dax1^{-/-}$ chez les individus mâles entraîne une dégénérescence progressive de l'épithélium testiculaire germinal et conduit à une stérilité mâle (Yu R.N. *et al.*, 1998). Au cours de la différenciation testiculaire, Dax-1 exerce un rôle crucial en régulant le développement des cellules myoïdes péritubulaires et la formation correcte des cordons testiculaires (Meeks J.J. *et al.*, 2003a; Meeks J.J. *et al.*, 2003b).

Chez le poulet, comme chez la tortue *Lepidochelys olivacea*, le profil d'expression

de Dax-1 est similaire à celui de la souris (Smith C.A. *et al.*, 2000; Torres Maldonado L.C. *et al.*, 2002). Par contre, chez la grenouille *Rana rugosa*, l'expression de Dax-1 diminue graduellement pendant le développement ovarien (Sugita J. *et al.*, 2001). Par conséquent, Dax-1 semble plutôt être impliqué dans le développement testiculaire chez la grenouille et le développement ovarien chez la tortue et le poulet. Chez l'alligator et le tilapia, aucune différence entre les individus mâles et femelles n'a été détectée (Western P.S. *et al.*, 2000; Wang D.S. *et al.*, 2002).

La protéine DAX-1 interagit avec la protéine SF1, sans modifier sa liaison à l'ADN mais en inhibant son activité transcriptionnelle (Ito M. *et al.*, 1997). Pour ce faire, grâce à son domaine de répression présent dans la partie C-terminale, DAX-1 recrute des co-répresseurs qui interférent avec la protéine SF1 (Crawford P.A. *et al.*, 1998). Récemment, une interaction directe entre les protéines SF1 et DAX1 via le motif LXXLL présent dans la partie N-terminale de DAX-1 a été démontrée (Suzuki T. *et al.*, 2003).

Par ailleurs, la protéine SF1 active la transcription du gène Dax-1. En effet, l'expression de Dax-1 est diminuée chez les souris $Sf1^{-/-}$ et un site de liaison pour la protéine SF1 a été identifié dans le promoteur de Dax-1 (Ikeda Y. *et al.*, 1996; Kawabe K. *et al.*, 1999). L'analyse de souris transgéniques a montré l'implication de SF1 dans la régulation de l'expression de Dax-1 au niveau des gonades en développement *in vivo* (Hoyle C. *et al.*, 2002). Néanmoins, l'expression de Dax-1 n'étant pas totalement éteinte chez les souris $Sf1^{-/-}$, d'autres facteurs doivent intervenir dans cette régulation (Ikeda Y. *et al.*, 1996). Dax-1 semble ainsi pouvoir réguler sa propre expression puisqu'un site de liaison pour Dax-1 a été retrouvé dans son promoteur (Zazopoulos E. *et al.*, 1997). D'autres facteurs comme WT1 (-KTS) coopérent avec un co-activateur, FHL2, pour activer la transcription de Dax-1 mais ce dernier semble également réguler l'expression de Wnt4 (Kim J. *et al.*, 1999; Du X. *et al.*, 2002; Sim E.U. *et al.*, 2002). Ce dernier gène, un membre de la famille *Wingless*, est aussi impliqué dans l'activation du gène Dax-1 (Mizusaki H. *et al.*, 2003; Jordan B.K. *et al.*, 2001).

Au cours du développement mâle, il a été supposé que Sry pouvait bloquer l'action de Dax-1 via Wnt-4, qui joue un rôle dans la différenciation sexuelle femelle (Vainio S. *et al.*, 1999). En effet, le profil d'expression coïncide, le niveau de transcrits Wnt4 est diminué à 11,5 jpc dans les embryons mâles tandis que Dax-1 ne baisse qu'à 12,5 jpc. Pour ce faire, Sry pourrait bloquer la fonction de Wnt4 en interférant avec la cascade de signalisation. Ceci a déjà été montré chez le xénope où Sox3, le plus proche homologue de Sry, inhibe directement la voie de signalisation Wnt (Zorn A.M. *et al.*, 1999). Chez les

souris femelles, le knock-out de Wnt4 conduit à une inversion sexuelle avec une persistance des canaux de Wolff, une absence des canaux de Müller et un développement des cellules de Leydig. Ainsi, Wnt4 joue un rôle important dans le contrôle de la féminisation, en inhibant la stéroïdogenèse dans les gonades femelles (Vainio S. *et al.*, 1999). Chez l'homme, un patient XY présentant une duplication d'une partie du chromosome 1 contenant Wnt4 montre une inversion sexuelle illustrant l'importance du dosage des gènes dans la différenciation sexuelle (Jordan B.K. *et al.*, 2001). De plus, la surexpression du gène Wnt4 conduit à la surexpression de Dax-1 suggérant une régulation de Dax-1 par Wnt4 (Jordan B.K. *et al.*, 2001). Cette hypothèse est confortée par les études *in vivo* qui montrent que l'expression de Dax-1 est diminuée chez des souris femelles $Wnt4^{-/-}$ (Mizusaki H. *et al.*, 2003). Au cours de la voie de signalisation Wnt, les protéines β-caténine et TCF interagissent et se lient sur les éléments de réponse TCF (Dale T.C., 1998). Ces derniers ont été trouvés au niveau du promoteur de Dax-1 chez la souris démontrant un contrôle direct de Dax-1 par la voie de signalisation Wnt4 (Jordan B.K. *et al.*, 2001). En fait, la β-caténine interagit avec la protéine SF1 et induit l'activation transcriptionnelle de Dax-1 (Jordan B.K. *et al.*, 2001).

La surexpression de Wnt4 interfère avec le développement normal de la vascularisation gonadique mâle et la synthèse de la testostérone. En fait, Wnt4 supprime la transcription des gènes de la stéroïdogenèse induite par la protéine SF1 en empêchant le synergisme fonctionnel entre les protéines SF1 et β-caténine (Jordan B.K. *et al.*, 2003).

J) un gène déterminant ovarien : Foxl2

Le syndrome BPES (Blepharophimosis Ptosis and Epicanthus inversus Syndrome) est une maladie humaine complexe caractérisée par des malformations des yeux et d'autres anomalies faciales. Il existe deux types de BPES : le type I est caractérisé par un arrêt du développement ovarien prématuré chez de nombreuses patientes tandis que le type II présente des fonctions ovariennes normales (Zlotogora J. *et al.*, 1983). Foxl2, un gène codant un facteur de transcription forkhead, semble agir comme un déterminant précoce de la différenciation ovarienne, et des malformations prématurées de l'ovaire en développement contribuent au phénotype BPES. Des mutations localisées à l'intérieur de la région codante ont été identifiées chez des patients atteints de ce syndrome (Crisponi L. *et al.*, 2001; De Baere E. *et al.*, 2001; Udar N. *et al.*, 2003).

Foxl2 est le premier marqueur connu de la différenciation ovarienne chez les mammifères. Chez la souris, l'expression de Foxl2 augmente dans l'ovaire peu après la

détermination sexuelle (Cocquet J. *et al.*, 2002). De même, chez les oiseaux, Foxl2 est un des premiers gènes de la cascade de la différenciation du sexe (Loffler K.A. *et al.*, 2003). Foxl2 semble également jouer un rôle de déterminant ovarien chez la tortue *Trachemys scripta*. En effet, l'expression de Foxl2 est plus importante à température féminisante dès le stade 15, moment où Dmrt1 est plus important à température masculinisante (Loffler K.A. *et al.*, 2003). Ainsi, la fonction de Foxl2 dans la différenciation ovarienne semble conservée chez les vertébrés.

Chez la chèvre et le porc, Foxl2 est aussi impliqué dans la différenciation ovarienne précoce (Pailhoux E. *et al.*, 2001a; Pailhoux E. *et al.*, 2001b). Chez la chèvre, la mutation PIS (Polled/Intersexed Syndrome) correspond à une délétion de 11,7 kb qui entraîne des inversions sexuelles XX (Pailhoux E. *et al.*, 2001a). Elle affecte un locus crucial pour la différenciation ovarienne contenant au moins deux gènes : Foxl2 et Pisrt1 (PIS Regulated Transcript 1), un ARN non codant (Pailhoux E. *et al.*, 2001a). Les gonades des chèvres XX $PIS^{-/-}$ inversées sexuellement présentent une diminution du niveau des transcrits aromatase tandis que l'expression des gènes mâles, comme Sox9 et AMH, est augmentée dès les premiers stades de la différenciation gonadique (Pailhoux E. *et al.*, 2002). Les résultats démontrent que l'absence des gènes Foxl2 et Pisrt1 conduit à un arrêt précoce de la différenciation ovarienne. Chez la chèvre, le gène Pisrt1 présente un haut niveau de transcrits pendant les stades précoces de la différenciation ovarienne alors qu'il n'est détecté que dans l'ovaire adulte chez la souris suggérant l'implication de mécanismes de contrôle de la détermination sexuelle différents (Pannetier M. *et al.*, 2003). En effet, Chez la chèvre, Pisrt1 a été supposé être un facteur anti-testiculaire «Z». Il inhiberait l'expression de Sox9 chez les individus femelles tandis que chez les mâles, SRY inhiberait Pisrt1 et permettrait l'expression de Sox9 (Pannetier M. *et al.*, 2003).

### 2) Le rôle des stéroïdes dans la différenciation sexuelle

Chez les vertébrés non mammaliens, les traitements avec des œstrogènes ou des androgènes modifient ou inversent la différenciation gonadique alors que chez les mammifères, la différenciation des gonades a lieu indépendamment de ces hormones. Après une petite introduction sur la biosynthèse des stéroïdes, nous présenterons l'influence des hormones sexuelles sur la différenciation sexuelle chez les vertébrés non mammaliens. Chez les mammifères, nous développerons une petite partie sur le rôle tardif des oestrogènes.

A) Biosynthèse des stéroïdes

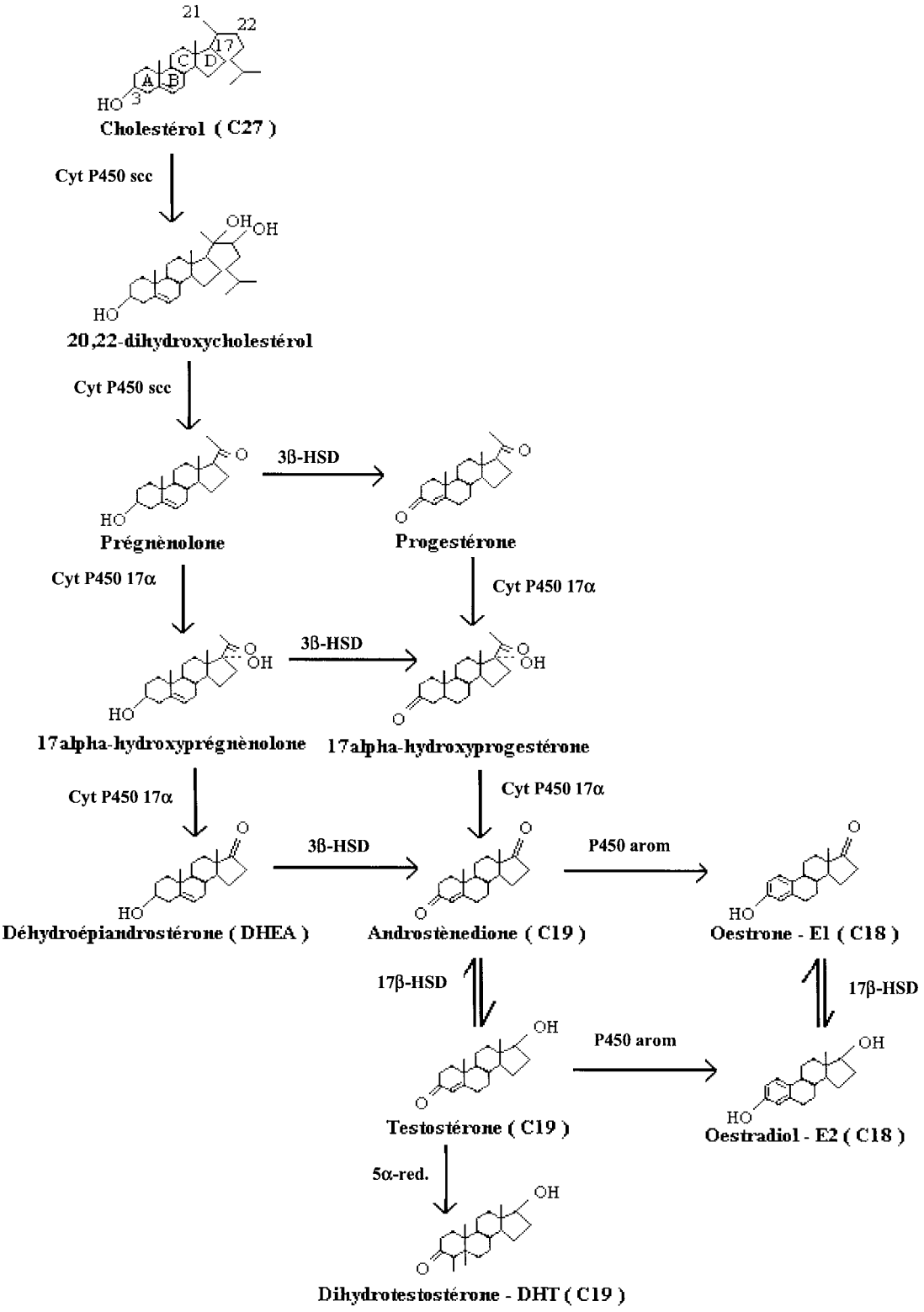



**Figure 13 : Synthèse des hormones stéroïdes sexuelles.** Différentes enzymes sont impliquées dans cette synthèse : le cytochrome P450 Scc (Cyt P450 scc), le cytochrome P450 17α (Cyt P450 17α), la 3β-hydroxystéroïde deshydrogénase (3β-HSD), la 17β-hydroxystéroïde deshydrogénase (17β-HSD), la 5α-réductase (5α-red.) et le cytochrome P450 aromatase (P450 arom).

La molécule précurseur des hormones stéroïdes est le cholestérol. La coupure de la chaîne latérale du cholestérol par le cytochrome P450 scc conduit à la formation de la prégnénolone (Fig.13).

La testostérone pour être active doit être convertie en métabolites. Elle peut ainsi être convertie soit en dihydrotestostérone par la 5α-réductase, soit en œstradiol par l'aromatase.

*a) l'aromatase*

L'aromatase est un complexe enzymatique faisant partie de la famille des cytochromes P450, qui est localisé au niveau du réticulum endoplasmique. Elle est composée d'une cytochrome P450 monooxygénase et d'une flavoprotéine NADPH réductase. L'hème de la protéine est responsable de la liaison du substrat stéroïde $C_{19}$ et catalyse une série de réactions menant à la formation du noyau A phénolique caractéristique des œstrogènes (Fig.14). La réaction enzymatique comprend trois étapes. Le groupe méthyl $C_{19}$ subit d'abord deux réactions d'hydroxylation puis une réaction de peroxydation (Fig.14).

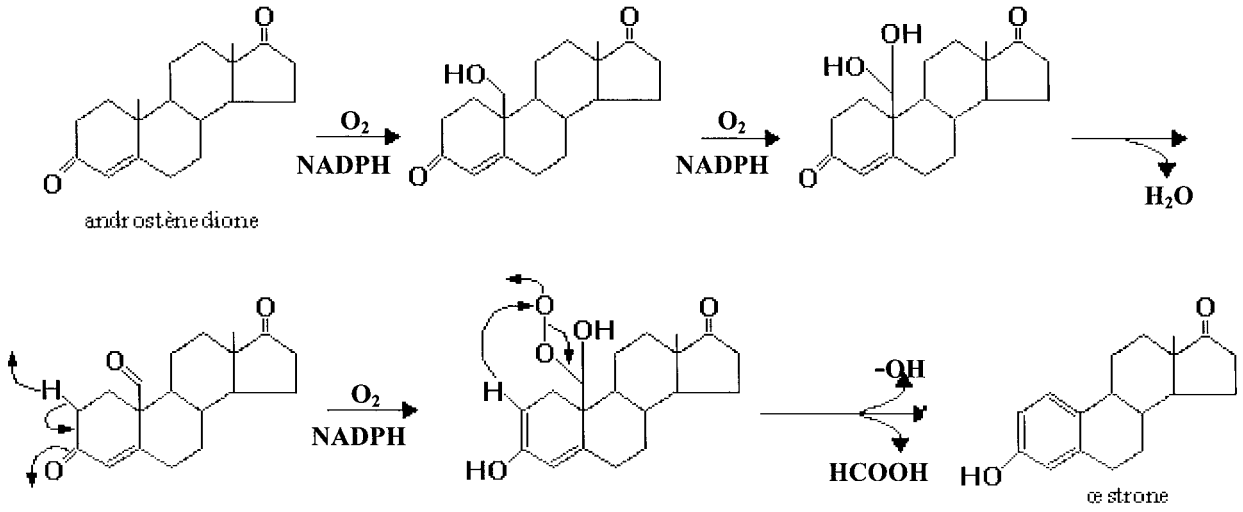



**Figure 14 : Réaction enzymatique catalysée par l'aromatase.** Le schéma détaille les différentes étapes de la réaction d'aromatisation de l'androstènedione en œstrone. La réaction nécessite 3 moles d'$O_2$ et 3 moles de NADPH pour une mole de substrat stéroïde $C_{19}$ métabolisé. (Modifié d'après Amarneh B. *et al.*, 1993).

*b) Structure génomique et expression tissu spécifique de l'aromatase*

L'aromatase est une enzyme hautement conservée à travers les classes de vertébrés. Le gène codant l'aromatase a été isolé chez l'homme, le rat, la souris, le poulet, la tortue *Malaclemys terrapin*, le xénope, le tilapia, la truite (Corbin C.J. *et al.*, 1988; Lephart E.D. *et al.*, 1990; Terashima M. *et al.*, 1991; McPhaul M.J. *et al.*, 1988; Jeyasuria P. et Place A.R., 1997; Miyashita K. *et al.*, 2000; Chang X.T. *et al.*, 1997; Tanaka M. *et al.*, 1992). Le gène localisé sur le chromosome 15 chez l'homme, contient 10 exons et le site du début de traduction est situé sur l'exon 2 (Chen S.A. *et al.*, 1988). La région 5' du gène contient de nombreuses séquences correspondant à l'exon 1 non codant (Fig.15). Un mécanisme d'épissage alternatif tissu spécifique a été mis en évidence chez les mammifères (Bershtein L.M., 1997). Ce dernier génère des transcrits avec des régions 5' différentes mais une région codante commune. Cette expression est dirigée par des promoteurs tissu-spécifiques en amont des exons 1 non traduits (Simpson E.R. *et al.*, 1994). Les différentes régions promotrices et les exons 1 non traduits s'étendent sur plus de 90 kb tandis que les exons codants sont restreints à 30 kb de la séquence génomique (Sebastian S. et Bulun S.E., 2001) (Fig.15).

La formation de transcrits aromatase comportant des régions 5' différentes est également observée chez la souris où trois variants Tov, Ttes et Tbr sont majoritairement retrouvés dans l'ovaire, le testicule et le cerveau respectivement. Leur expression tissu spécifique est aussi dirigée par des promoteurs différents (Golovine K. *et al.*, 2003). De même, chez l'oiseau *Taeniopygia guttata*, les isoformes présentent deux exons non codant : 1a et 1b. L'isoforme contenant l'exon 1b est majoritaire dans l'ovaire tandis que celle contenant l'exon 1a est présente à la fois dans le cerveau, le testicule et l'ovaire (Ramachandran B. *et al.*, 1999). Chez la raie, *Dasyatis sabina*, l'aromatase contient aussi différentes 5' UTR dans l'ovaire, le rein et le cerveau (Ijiri S. *et al.*, 2000). En revanche chez de nombreux téléostéens, deux transcrits provenant de deux gènes différents ont été isolés dans le cerveau et dans l'ovaire. Le gène aromB, est majoritairement exprimé dans le cerveau tandis que le gène aromA, est principalement exprimé dans l'ovaire (Kwon J.Y. *et al.*, 2001; Kishida M. et Callard G.V., 2001; Tchoudakova A. et Callard G.V., 1998; Chiang E.F. *et al.*, 2001b). Ces deux gènes sont localisés sur des chromosomes différents et proviennent sûrement d'un événement de duplication ancien (Harvey S.C. *et al.*, 2003; Chiang E.F. *et al.*, 2001b). Chez le poisson zèbre, les deux formes A et B présentent 61% d'identité de séquence (Kishida M. et Callard G.V., 2001). Chez la truite, les isoformes A et B ont aussi été isolées, cependant un épissage alternatif au niveau du cerveau génère

deux formes supplémentaires : I et II. La forme II est soluble puisqu'elle a perdu la partie N-terminale transmembranaire qui s'insère dans le réticulum endoplasmique (Valle L.D. *et al.*, 2002). L'expression de l'aromatase chez le porc est unique par rapport aux autres mammifères : trois gènes distincts codent trois isoformes différentes. Ces variants I, II, III sont exprimés dans l'ovaire, le placenta et les tissus embryonnaires respectivement (Graddy L.G. *et al.*, 2000).

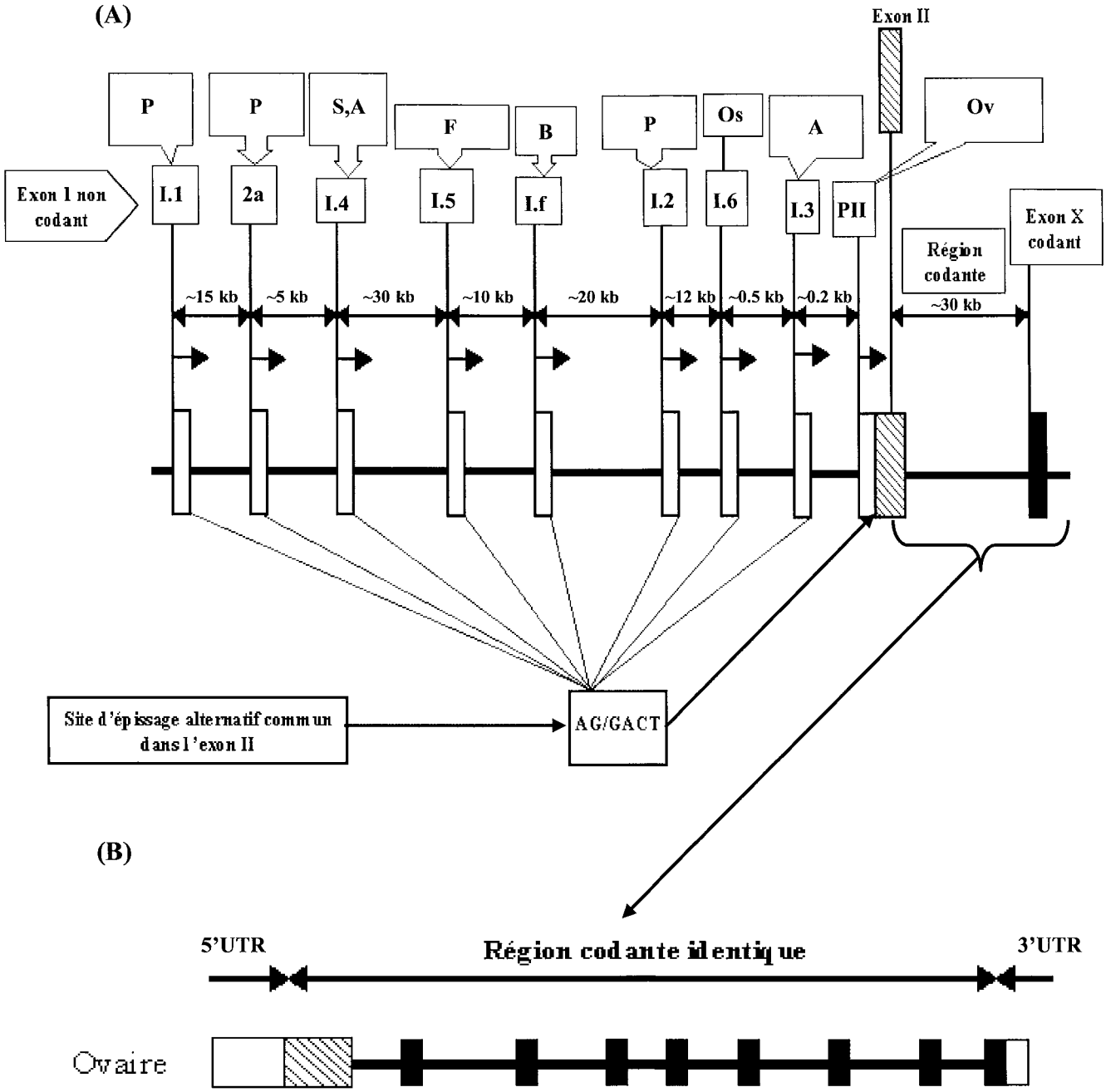



**Figure 15 : Organisation génomique du gène de l'aromatase humaine.** (A) La région 5' du gène contient de nombreuses séquences correspondant aux exons 1 non codant. Ces derniers contiennent différents promoteurs tissu-spécifiques : du placenta (P), de la peau (S), du tissu adipeux (A), des tissus fœtaux (F), du cerveau (B), des os (Os), de l'ovaire (Ov). Chaque tissu contient une 5'UTR unique générée par un épissage alternatif avec un site commun accepteur unique présent dans l'exon II (AG/GACT). La région codante est identique et ne s'étend que sur 30 kb de la séquence génomique tandis que les différentes régions promotrices et les exons 1 non codants s'étendent sur plus de 90 kb. (B) Structure du messager de l'aromatase dans l'ovaire. La région codante comprend les exons II à X. 5'UTR correspond au premier exon non traduit contrôlé par le promoteur proximal II. Le cadre en blanc après l'exon X correspond à la région 3' non codante (Modifié d'après Sébastian et Bulun, 2001).

B) Récepteurs des stéroïdes

Les androgènes agissent via un seul type de récepteur AR (Trapman J. *et al.*, 1988) tandis que l'action des œstrogènes peut être relayée par des récepteurs différents. Chez les mammifères, il existe deux types de récepteurs aux œstrogènes : ERα (Walter P. *et al.*, 1985) et ERβ (Kuiper G.G. *et al.*, 1996). Chez les vertébrés non mammaliens, un seul type de récepteur aux œstrogènes a été cloné chez les oiseaux (Jacobs E.C. *et al.*, 1997; Smith C.A. *et al.*, 1997), les reptiles (Bergeron J.M. *et al.*, 1998; Sumida K. *et al.*, 2001) alors que chez les poissons téléostéens trois types ont été identifiés : ERα, ERβ et ERγ. Ce dernier type (ERγ) semble être issu d'une duplication de ERβ (Hawkins M.B. *et al.*, 2000). Chez *Xenopus laevis*, deux gènes ERα ont été isolés : ERα1 et ERα2 tandis que chez *Xenopus tropicalis*, deux récepteurs ERα et ERβ ont été clonés (Wu K.H. *et al.*, 2003).

C) Rôle des stéroïdes chez les mammifères

Chez les mammifères, l'implication des œstrogènes dans la spermatogenèse a été démontrée par des études de knock-out du récepteur aux œstrogènes et de l'aromatase. En effet, des souris ERαKO mâles sont stériles suite à une réduction du nombre et de la motilité des spermatozoïdes dans l'épididyme (Eddy E.M. *et al.*, 1996). Au contraire, des souris ERβKO mâles sont fertiles (Krege J.H. *et al.*, 1998) alors que les doubles mutants ERαβKO mâles ont un phénotype similaire à celui des souris ERαKO (Couse J.F. *et al.*, 1999). Les souris knock-out pour l'aromatase, ArKO, sont initialement fertiles mais la spermatogenèse cesse progressivement pour s'arrêter complétement à un an d'âge démontrant une action directe sur le développement des cellules germinales et la fertilité (Robertson K.M. *et al.*, 1999).

Les souris doubles mutantes ERαβKO femelles présentent une transdifférenciation des follicules ovariens en des structures ressemblant aux tubules séminifères. Dans ces derniers, on observe des cellules ressemblant aux cellules de Sertoli qui expriment des marqueurs mâles comme l'AMH et SOX9 (Couse J.F. *et al.*, 1999; Dupont S. *et al.*, 2000). L'expression ectopique de Sox9 dans les cellules de la granulosa précède l'apparition des cellules de Sertoli (Dupont S. *et al.*, 2003). Les souris ERαKO et ERβKO possèdent des ovaires normaux à la naissance et durant le développement néonatal mais au début de la maturité sexuelle, le phénotype se distingue entre les deux types de souris knock-out. Les souris ERαKO présentent un ovaire anovulatoire caractérisé par l'accumulation de

follicules larges, hémorragiques et cystiques (Schomberg D.W. *et al.*, 1999). Chez les souris ERβKO, l'ovulation est peu fréquente et inefficace avec présence de petits corps jaunes peu denses (Krege J.H. *et al.*, 1998). Les souris ArKO femelles ont un phénotype ovarien normal avec présence de nombreuses cellules de la granulosa. Cependant, les souris sont stériles à cause de l'arrêt du développement folliculaire au stade de la formation de l'antrum et une absence complète de corps jaunes (Fisher C.R. *et al.*, 1998; Britt K.L. *et al.*, 2000). Avec l'âge, le phénotype ovarien s'aggrave et à un an d'âge, il n'y a plus de follicules secondaires, ni de follicules antraux et les follicules primaires deviennent atrétiques. Donc, les oestrogènes sont nécessaires pour une folliculogénèse et une ovulation normale (Britt K.L. *et al.*, 2000; Britt K.L. *et al.*, 2001).

Chez les marsupiaux, les œstrogènes sont susceptibles d'affecter la différenciation gonadique. En effet, le traitement d'individus génétiquement mâles avec du benzoate d'œstradiol empêche la différenciation testiculaire (Coveney D. *et al.*, 2001). Il en est de même chez l'opossum *Didelphis virginiana* où les gonades des mâles génétiques sont féminisées par l'oestradiol tandis que la testostérone ne modifie pas la différenciation sexuelle des gonades de femelles génétiques (Burns R.K., 1955).

Les androgènes sont importants pour le développement et le maintien des structures secondaires (Voir chapitre suivant) mais aussi pour l'initiation et le maintien de la spermatogénèse. Chez des individus XY présentant le syndrome d'insensibilité aux androgènes, quatre types de mutations différentes du récepteur aux androgènes ont été identifiés (Brinkmann A.O., 2001).

### D) Rôle des stéroïdes chez les vertébrés non mammaliens

Chez les vertébrés non mammaliens, la stéroïdogenèse gonadique est potentiellement active avant le début de la différenciation gonadique histologique. Les enzymes exigées pour une stéroïdogenèse complète sont présentes aux stades précoces chez les embryons mâles et femelles. Ceci est le cas des poissons comme la truite (Van den Hurk R. *et al.*, 1982; Govoroun M. *et al.*, 2001) et le tilapia (Hines G.A. *et al.*, 1999; Nakamura M. *et al.*, 1998), de la tortue *Emys orbicularis* (Pieau C. *et al.*, 2001) et du poulet (Nomura O. *et al.*, 1999).

*a) Le rôle des androgènes*

La testostérone peut masculiniser les amphibiens de la famille des Ranidae et des Hylidae (Gallien L., 1962) ainsi que de nombreux poissons (Borg B., 1994). Chez les reptiles, l'effet masculinisant de la testostérone est décrit uniquement chez le lézard *Calotes versicolor* (Ganesh S. et Raman R., 1995). Chez la tortue *Emys orbicularis*, cette hormone n'altère pas l'effet d'une température féminisante. Cependant, elle entraîne la féminisation totale ou partielle des embryons incubés à température masculinisante (Pieau C., 1974). Cet effet paradoxal a non seulement été retrouvé chez d'autres espèces TSD (Wibbels T. et Crews D., 1992), mais aussi chez certains amphibiens (Gallien L., 1962; Hayes T.B., 1998; Wallace H. *et al.*, 1999). Il est expliqué par l'aromatisation de la testostérone en œstradiol. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation d'androgènes non aromatisables comme la dihydrotestostérone (DHT). En effet, chez la tortue *Trachemys scripta*, cet androgène entraîne une différenciation mâle accrue ou complète à température pivotante où les deux sexes sont normalement obtenus en proportions égales mais la descendance n'est pas totalement mâle à température féminisante (Crews D. *et al.*, 1996). Chez le xénope, la DHT et la méthyltestostérone induisent également une masculinisation tandis que la testostérone n'a pas d'effet (Bogi C. *et al.*, 2002). Cependant, chez la tortue *Trachemys scripta*, le traitement des embryons avec un inhibiteur de la 5α réductase, enzyme qui convertit la testostérone en DHT, n'empêche pas la différenciation testiculaire à température masculinisante (Crews D. et Bergeron J.M., 1994). Néanmoins, les androgènes 11-oxygénés semblent être impliqués dans la différenciation testiculaire chez les poissons. Effectivement, ils ont un effet masculinisant chez la truite (Van den Hurk R. et Van Oordt P.G., 1985) et chez le tilapia (Baroiller J.F. et Toguyeni A., 1995).

L'expression dimorphique de la 11β hydroxylase chez la truite suggère que cette enzyme est un facteur clé de la différenciation testiculaire. Elle est 100 fois plus exprimée chez les individus mâles que chez les individus femelles avant l'apparition des premiers signes histologiques de la différenciation (Liu S. *et al.*, 2000). De plus, le traitement de femelles génétiques avec la 11β hydroxyandrostenedione entraîne une masculinisation même à faible dose (Govoroun M. *et al.*, 2001). Cependant, la 11β hydroxylase ne semble pas jouer un rôle majeur chez le tilapia : son expression est faible au cours de la différenciation testiculaire et ovarienne et n'augmente pas lors de la masculinisation de femelles génétiques (D'Cotta H. *et al.*, 2001a). En conclusion, le rôle des androgènes dans la différenciation sexuelle n'est pas encore clairement démontré.

*b) Le rôle des œstrogènes*

Les œstrogènes semblent jouer un rôle crucial dans le développement ovarien chez les vertébrés non mammaliens. Le traitement d'embryons mâles avec des oestrogènes conduit à un effet féminisant chez de nombreux poissons (Yamamoto T., 1962), chez plusieurs amphibiens (Hayes T.B., 1998; Wallace H. *et al.*, 1999; Bogi C. *et al.*, 2002; Saidapur S.K. *et al.*, 2001), chez le poulet (Scheib D., 1983) mais aussi chez les espèces TSD. Par exemple, l'injection d'œstrogènes dans les œufs de la tortue *Emys orbicularis* induit une différenciation ovarienne à température masculinisante (Pieau C., 1996). Ceci est également le cas chez l'alligator (Lance V.A. et Bogart M.H., 1992). Par ailleurs, la température féminisante et les œstrogènes semblent exercer un effet synergique sur la différenciation des gonades, la période thermosensible chevauchant la période hormonosensible (Crews D. *et al.*, 1994).

Ce rôle des œstrogènes est confirmé par l'utilisation d'anti-œstrogènes qui, chez certaines espèces, conduisent à une masculinisation. L'utilisation du tamoxifène, un antioestrogène empêchant la liaison des œstrogènes sur leurs récepteurs, entraîne une masculinisation chez le poulet (Scheib D., 1983) et la tortue *Emys orbicularis* (Dorizzi M. *et al.*, 1991). Néanmoins, le tamoxifène n'a pas d'effet chez la truite et le tilapia, l'alligator et la tortue *Trachemys scripta* (Guiguen Y. *et al.*, 1999; Lance V.A. et Bogart M.H., 1991; Wibbels T. et Crews D., 1992).

En conclusion, le niveau d'œstrogènes semble jouer un rôle important pour diriger la différenciation ovarienne. Par conséquent, le niveau d'aromatase, l'enzyme responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes, est un élément clé de la différenciation ovarienne chez les vertébrés non mammaliens.

*c) L'aromatase*

*** Mesure d'activité**

Chez les vertébrés non mammaliens, les mesures d'activité aromatase sont en accord avec une implication des œstrogènes dans la différenciation ovarienne : chez les reptiles TSD, l'activité aromatase est faible au début de la TSP puis elle augmente exponentiellement durant la différenciation ovarienne. Ceci a été observé chez la tortue *Emys orbicularis* (Desvages G. et Pieau C., 1992), le crocodile *Crocodylus porosus* (Smith C.A. et Joss J.M., 1994b) et l'alligator *Alligator mississipiensis* (Smith C.A. *et al.*, 1995). Les résultats sont similaires chez les poissons comme le tilapia et la truite (Guiguen Y. *et*

*al.*, 1999) ainsi que chez le poulet (Elbrecht A. et Smith R.G., 1992).

*** Mesure d'expression**

Les résultats des mesures d'activités sont corrélés avec ceux des études d'expression. Chez le poulet, les transcrits aromatase sont uniquement détectés dans les gonades femelles, juste après le début de la différenciation gonadique tandis que le récepteur ERα est exprimé dans les deux sexes avant le début de la différenciation gonadique (Yoshida K. *et al.*, 1996; Smith C.A. *et al.*, 1997). L'expression différentielle de l'aromatase et de ER permet d'expliquer le développement ovarien unilatéral chez les oiseaux. En effet, l'absence de transcrits ER dans la gonade femelle droite a pour conséquence la régression de cette gonade (Andrews J.E. *et al.*, 1997; Nakabayashi O. *et al.*, 1998). Chez le poulet et le xénope, le début d'expression de l'aromatase est corrélé avec les premiers signes histologiques de la différenciation gonadique (Yoshida K. *et al.*, 1996; Miyashita K. *et al.*, 2000).

Cependant, l'expression ou l'activité de l'aromatase ne semble pas toujours initier la différenciation ovarienne mais semble exercer un rôle essentiel plus en aval dans la cascade de la différenciation sexuelle. En effet, chez l'alligator, l'augmentation de l'activité aromatase chez les femelles n'est détectée qu'après la TSP (Milnes M.R. *et al.*, 2002). En parallèle, le niveau de transcrits aromatase n'est pas différent entre les embryons mâles et femelles jusqu'à la fin de la TSP puis il augmente à température féminisante (Gabriel W.N. *et al.*, 2001). Il en est de même chez la tortue *Trachemys scripta* (Murdock C. et Wibbels T., 2003b). Chez le tilapia, les transcrits aromatase sont présents dans les gonades mâles et femelles mais l'augmentation du niveau des transcrits chez les femelles n'a lieu qu'après l'initiation de la différenciation sexuelle (Kitano T. *et al.*, 1999; Kwon J.Y. *et al.*, 2001). Chez ce poisson et la truite, les transcrits aromatase dans les gonades femelles sont 100 fois plus nombreux que dans les gonades mâles (Guiguen Y. *et al.*, 1999).

Ainsi, l'augmentation de l'activité et de l'expression de l'aromatase est indispensable pour la différenciation ovarienne et le maintien d'un faible niveau d'expression est exigé pour la différenciation testiculaire.

Effectivement, chez la tortue *Malaclemys terrapin*, le traitement d'embryons par des œstrogènes au stade 14, soit au début de la période thermosensible, induit l'augmentation de l'expression de l'aromatase à température masculinisante (Place A.R. *et al.*, 2001). De même, chez le medaka, la féminisation d'individus juvéniles génétiquement

mâles par l'exposition à des concentrations élevées de 17α éthinylestradiol pendant deux mois induit une augmentation de l'expression de l'aromatase (Scholz S. et Gutzeit H.O., 2000). Chez la truite, l'action masculinisante des androgènes 11-oxygénés s'accompagne d'une réduction de l'expression de l'aromatase qui semble nécessaire pour induire la différenciation testiculaire (Govoroun M. *et al.*, 2001).

*** Inhibiteurs d'aromatase**

L'implication de l'aromatase dans la différenciation sexuelle a été confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs.

Le traitement d'embryons de poulet femelles (ZW) avec le fadrozole, un inhibiteur d'aromatase empêchant la conversion des androgènes en œstrogènes, mène à la formation de deux testicules (Elbrecht A. et Smith R.G., 1992). Chez cette espèce, l'inversion sexuelle induite par l'injection du fadrozole au début du développement embryonnaire, conduit à une transdifférenciation de l'épithélium ovarien en épithélium testiculaire (Vaillant S. *et al.*, 2001a). Elle est accompagnée de la co-expression des trois gènes marqueurs mâles chez le poulet : Sf1, Sox9 et AMH (Vaillant S. *et al.*, 2001b). Les niveaux de testostérone et d'œstradiol dans le plasma de ces femelles sont de bons indicateurs du degré d'inversion sexuelle avant la différenciation gonadique (Vaillant S. *et al.*, 2003). Le fadrozole a également un effet masculinisant chez le tilapia (Kwon J.Y. *et al.*, 2000; Afonso L.O. *et al.*, 2001), les tortues *Emys orbicularis*, *Trachemys scripta* et *Chelydra serpentina* (Dorizzi M. *et al.*, 1994; Wibbels T. et Crews D., 1994) et une espèce parthénogénétique de lézard *Cnemidophorus uniparens* (Wennstrom K.L. et Crews D., 1995). Chez *Xenopus laevis*, le traitement de gonades XX en culture avec le même inhibiteur conduit à un phénotype mâle (Miyata S. et Kubo T., 2000). Chez le poisson hermaphrodite *Acanthopagrus schlegeli*, le changement de sexe dépend du niveau des trois composantes : œstradiol, activité aromatase et ER dans le tissu ovarien. L'implication de l'aromatase dans ce processus est démontrée puisque des inhibiteurs de l'aromatase comme le fadrozole bloquent le changement de sexe (Lee Y.H. *et al.*, 2001).

L'inversion sexuelle induite par les inhibiteurs d'aromatase est la conséquence de la diminution de la quantité d'oestrogènes dûe à une réduction de l'activité ou de l'expression de l'aromatase. Chez le poisson *Paralichthys olivaceus*, le traitement de femelles génétiques avec la 17α méthyltestostérone (inhibiteur d'aromatase) ou le fadrozole, induit une inversion sexuelle ainsi que la suppression de l'expression de l'aromatase (Kitano T. *et al.*, 2000). De même, chez le tilapia et la truite, le traitement avec un inhibiteur

d'aromatase (ATD) entraîne une diminution de l'activité aromatase et une masculinisation (Guiguen Y. *et al.*, 1999). Chez *Rana catesbeiana*, la 4-hydroxyandrostenedione (inhibiteur de l'aromatase) bloque l'activité aromatase des ovaires résultant en une accumulation de testostérone et en la transformation des ovaires en testicules (Yu N.W. *et al.*, 1993). De même, chez la grenouille *Rana rugosa*, le haut niveau de transcrits AR, deux fois plus élevé chez les mâles par rapport aux femelles, supprime directement ou indirectement l'expression de l'aromatase et induit la différenciation testiculaire (Ohtani H. *et al.*, 2003).

Par conséquent, l'aromatase joue un rôle clé dans la conversion des androgènes en oestrogènes au cours de la différenciation ovarienne chez les vertébrés non mammaliens. Chez *Emys orbicularis*, la différenciation d'un ovotestis a même pu être induit par un traitement avec un inhibiteur d'aromatase commencé à des stades tardifs du développement embryonnaire, entre la fin de la TSP et l'éclosion. La transdifférenciation des lacunes ovariennes en cordons testiculaires est observée chez les animaux qui présentent la plus faible activité aromatase au début du traitement (Belaid B. *et al.*, 2001).

*** Effet de la température**

La température modifie l'expression du gène de l'aromatase au cours de la différenciation gonadique.

En effet, chez *Malaclemys terrapin*, le niveau de transcrits aromatase augmente dans les gonades à température féminisante tandis qu'il reste faible à température masculinisante (Jeyasuria P. et Place A.R., 1997). Ceci est également le cas chez l'alligator (Gabriel W.N. *et al.*, 2001). Il en est de même chez le tilapia, la masculinisation de femelles génétiques par une température d'élevage importante entraîne une répression du gène de l'aromatase (D'Cotta H. *et al.*, 2001b). Cette inhibition est indépendante de l'effet masculinisant puisque l'élevage de mâles à la même température conduit aussi à une diminution de l'expression de l'aromatase (D'Cotta H. *et al.*, 2001b). Des résultats similaires ont été observés chez le poisson *Paralichthys olivaceus* où l'inversion sexuelle de femelles génétiques par l'augmentation de la température d'élevage entraîne la suppression de l'expression de l'aromatase (Kitano T. *et al.*, 1999). Ainsi, la température semble réguler directement ou indirectement l'expression de cette enzyme chez les espèces dont le déterminisme est sensible à la température. La température n'agit pas qu'au niveau gonadique, elle peut également exercer une influence au niveau cérébral. En effet, chez le tilapia *Oreochromis mossambicus*, la température modifie l'expression des gènes

aromatase, ERα et ERβ durant le processus de différenciation sexuelle du cerveau (Tsai C.L. *et al.*, 2003). Un facteur thermosensible présent dans le cerveau pourrait être la cible de la température et ainsi diriger la différenciation sexuelle gonadique chez les espèces TSD. En effet, chez la tortue *Trachemys scripta*, le cerveau semble être un site de réponse à la température puisqu'une activité différentielle de l'aromatase est détectée au niveau du cerveau durant la TSP alors qu'aucune différence n'est observée dans les gonades (Crews D. *et al.*, 2001; Willingham E. *et al.*, 2000).

*** Aromatase, cerveau et différenciation gonadique**

Le cerveau est un site de synthèse de stéroïdes. Notamment, l'aromatase a été détectée dans de nombreuses régions du cerveau adulte chez de nombreuses espèces. Elle est principalement présente au niveau des aires impliquées dans le contrôle du comportement reproducteur : le bulbe olfactif, le télencéphale, l'hypothalamus et l'hypophyse (Forlano P.M. *et al.*, 2001; Menuet A. *et al.*, 2003; Gabriel W.N. *et al.*, 2001; Kato J. *et al.*, 1997; Gonzalez A. et Piferrer F., 2003; Chiang E.F. *et al.*, 2001b; Tong S.K. *et al.*, 2001).

Chez l'oiseau *Taeniopygia guttata*, le télencéphale est la source majeure de synthèse d'œstrogènes (Shen P. *et al.*, 1994). Chez ces derniers, l'aromatase est impliquée dans la différenciation sexuelle du comportement et participe au développement du chant chez le mâle (Bottjer S.W. *et al.*, 1985; Schlinger B.A. et Arnold A.P., 1991a). Les androgènes semblent aussi affecter le système de chant des oiseaux (Schlinger B.A. et Arnold A.P., 1991b). Notamment, la testostérone semble réguler l'aromatase télencéphalique puisque la masculinisation du chant de la femelle dûe à un traitement à la testostérone conduit à une augmentation de l'expression et de l'activité de l'aromatase dans le striatum caudomédial (Fusani L. *et al.*, 2001).

Chez la caille, le développement du comportement sexuel est contrôlé par le noyau hypothalamique qui est plus large chez les femelles que chez les mâles, mais l'activité aromatase est plus importante chez ces derniers. Cette enzyme semble jouer un rôle important puisque le traitement par des inhibiteurs d'aromatase réduit le comportement copulateur mâle (Balthazart J., 1997). Chez le lézard *Cnemidophorus guttata*, les récepteurs ER et PR (Récepteur progestérone) sont différentiellement régulés et augmentent lors d'un traitement au benzoate d'œstradiol dans une aire du cerveau qui contrôle le comportement sexuel adulte (Wennstrom K.L. *et al.*, 2003). Chez *Rana esculenta*, l'activité aromatase fluctue au cours du cycle reproducteur dans l'hypothalamus

(Guerriero G. *et al.*, 2000).

Chez de nombreuses espèces de mammifères, la production locale d'aromatase semble être impliquée dans la différenciation sexuelle du cerveau. Chez le rat, l'aromatase présente une expression différentielle durant la période critique de la différenciation sexuelle dimorphique du cerveau (Lauber M.E. *et al.*, 1997). Chez la souris, il existe un dimorphisme sexuel dans des régions spécifiques du cerveau avec une plus haute production d'œstrogènes dans le cerveau mâle (Hutchison J.B. *et al.*, 1995). Une activité aromatase plus importante dans le cerveau mâle par rapport au cerveau femelle est aussi observée chez le poisson *Dicentrarchus labrax* durant la période de différenciation gonadique (Gonzalez A. et Piferrer F., 2003). Il en est de même chez la tortue *Chelydra serpentina*, où l'expression cérébrale du gène aromatase est trois fois supérieure à température masculinisante qu'à température féminisante (Place A.R. *et al.*, 2001).

Au contraire, chez d'autres espèces, le niveau d'activité aromatase est plus élevé dans les cerveaux femelles. Ceci est le cas chez le tilapia et la tortue *Trachemys scripta* (D'Cotta H. *et al.*, 2001b; Willingham E. *et al.*, 2000). Chez la tortue *Malaclemys terrapin*, l'expression aromatase est plus importante dans le cerveau femelle par rapport au cerveau mâle au début de la TSP (Jeyasuria P. et Place A.R., 1997). Puisque le cerveau présente une expression sexuelle dimorphique de l'aromatase avant le début de la différenciation gonadique, il a été supposé qu'il pourrait constituer un relais dans la différenciation gonadique chez les espèces TSD (Jeyasuria P. et Place A.R., 1998). Effectivement, chez *Trachemys scripta*, aucune différence d'activité aromatase n'est détectée au niveau des gonades au début de la TSP alors que l'activité est plus élevée dans le cerveau femelle (Willingham E. *et al.*, 2000). De même, chez la tortue *Malaclemys terrapin*, l'augmentation d'expression dans le cerveau femelle précède l'expression gonadique chez les femelles (Jeyasuria P. et Place A.R., 1997). Chez ces deux tortues, la température agirait au niveau du cerveau en modulant directement ou indirectement l'activité ou l'expression du gène de l'aromatase. Chez le tilapia, la masculinisation de femelles génétiques par une température d'élevage importante conduit à la répression de l'expression de l'aromatase dans les gonades et à une diminution de l'activité aromatase d'environ 3 fois au niveau du cerveau suggérant que la répression peut aussi être exigée dans le cerveau afin de diriger la différenciation vers un testicule (D'Cotta H. *et al.*, 2001b). Néanmoins, les études d'expression de l'aromatase cérébrale ont montré une augmentation du nombre de transcrits pendant la différenciation sexuelle avec peu de différence entre les individus mâles et femelles (Kwon J.Y. *et al.*, 2001). De même, chez

l'alligator, l'activité de l'aromatase dans le cerveau n'est pas directement responsable de la différence induite dans les gonades puisque l'activité détectée dans le cerveau est aussi importante durant la différenciation gonadique mâle et femelle (Milnes M.R. *et al.*, 2002).

*** Régulation de l'aromatase au niveau cérébral et gonadique**

Chez *Rana esculenta*, l'activité aromatase fluctue pendant le cycle reproducteur dans l'hypothalamus alors que le niveau relatif des protéines aromatase change peu suggérant l'implication de mécanismes de régulation post-transcriptionnels (Guerriero G. *et al.*, 2000). Chez la caille, l'activité aromatase est contrôlée par deux mécanismes différents. Une première régulation rapide par un processus $Ca^{2+}$ dépendant (5min) et un deuxième processus lent contrôlant la transcription (8h00). Un processus de phosphorylation est impliqué dans la régulation rapide de l'activité aromatase. En effet, l'activité aromatase dans des homogénats hypothalamiques est rapidement diminuée dans des conditions qui augmentent la phosphorylation des protéines. Cette diminution d'activité est bloquée par des inhibiteurs de kinases (Balthazart J. *et al.*, 2001). La phosphorylation est réversible puisque l'activité aromatase est restaurée par des phosphatases. 15 sites consensus de phosphorylation, au niveau de résidus serine, thréonine et tyrosine, ont été identifiés sur la protéine aromatase mais seulement deux sont sensibles aux protéines kinases qui affectent l'activité aromatase (Balthazart J. *et al.*, 2003).

Dans les glandes surrénales et dans les gonades, SF1 est un régulateur transcriptionnel positif d'un grand nombre d'enzymes stéroïdogéniques (Lala D.S. *et al.*, 1992). Notamment, le gène de l'aromatase est activé par la liaison de SF1 sur son promoteur chez le rat, ainsi que chez l'homme (Lynch J.P. *et al.*, 1993; Michael M.D. *et al.*, 1995). Un site de liaison pour la protéine SF1 a aussi été identifié dans la région promotrice de l'aromatase du poulet (Kudo T. *et al.*, 1996) alors qu'il en existe deux chez le medaka et le tilapia (Tanaka M. *et al.*, 1995; Yoshiura Y. *et al.*, 2003). Au niveau cérébral, chez l'oiseau *Taeniopygia guttata*, l'expression de l'aromatase et de SF1 se superposent dans l'hypothalamus mais pas dans le télencéphale adulte. Ainsi, il a été supposé que la protéine SF1 régulerait l'aromatase uniquement dans l'hypothalamus (Agate R.J. *et al.*, 2002). Chez les poissons, l'analyse des promoteurs des gènes aromatase A et B a révélé la présence de différents éléments de réponse impliquant des mécanismes régulateurs différents. Le promoteur de l'aromatase A contient généralement des sites de liaison CRE, ERE (Estrogen Responsive Element), AhR (Aryl hydrocarbon-responsive element) et pour SF1 (Yoshiura Y. *et al.*, 2003; Kazeto Y. *et al.*, 2001; Tanaka M. *et al.*,

1995; Tchoudakova A. *et al.*, 2001). Le promoteur de l'aromatase B contient des éléments de réponse pour CRE, ERE, PPARα/RXRα, GATA2 et TATA (Kazeto Y. *et al.*, 2001; Tchoudakova A. *et al.*, 2001). Chez le poisson zèbre, les gènes aromatase A et B répondent différemment aux œstrogènes. En effet, seule l'expression de l'aromatase B est augmentée après une exposition à la 17α méthyltestostérone, à l'éthinylestradiol ou à l'œstradiol (Trant J.M. *et al.*, 2001; Kishida M. et Callard G.V., 2001). Comme pour l'aromatase A des poissons, le site de liaison pour la protéine SF1 est uniquement présent au niveau du promoteur ovarien chez l'oiseau *Taeniopygia guttata* (Ramachandran B. *et al.*, 1999).

## IV) La différenciation du tractus génital

A l'exception des cyclostomes et des poissons téléostéens, deux types de gonoductes se mettent en place chez les vertébrés. Au début du développement, les deux voies génitales sont similaires chez les individus mâles et femelles (Fig.16). En fait, l'embryon indifférencié contient à la fois les canaux de Wolff qui servent à l'évacuation des gamètes chez les mâles et les canaux de Müller qui jouent un rôle identique chez les femelles. Les hormones produites par la gonade vont diriger la différenciation du tractus (Fig.16). Ceci a été démontré par l'étude de la différenciation du tractus après l'ablation des gonades. En effet, chez le lapin, la castration précoce d'un fœtus mâle conduit au développement d'un tractus femelle alors que l'organogenèse du tractus est normale chez un fœtus femelle (Jost A., 1947). Les résultats sont similaires chez la souris et le rat (Raynaud A. et Frilley M., 1947; Wells L.J. *et al.*, 1954), montrant que chez les mammifères, le sexe femelle correspond au sexe neutre. Ainsi, le testicule fœtal élabore des hormones qui vont stimuler la différenciation mâle du tractus et l'involution des canaux de Müller. Chez les oiseaux, les hormones des gonades des deux sexes interviennent dans la différenciation des caractères sexuels. En l'absence d'hormones, le syrinx et le tubercule génital se développent vers la voie mâle tandis que les canaux de Müller sont de type femelles (Wolff Et. et Wolff Em., 1951).

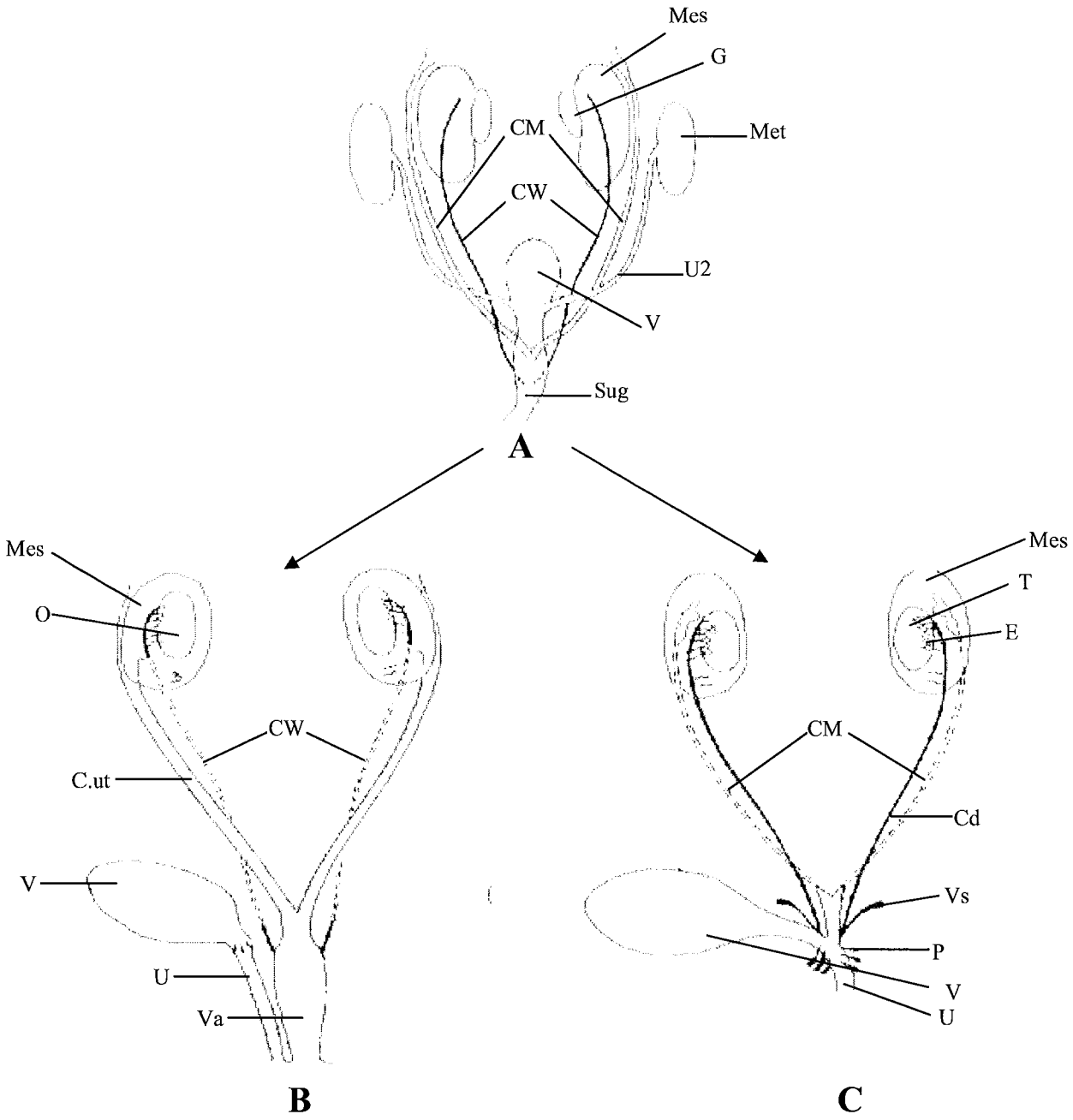



**Figure 16 : Différenciation du tractus génital chez les mammifères.** (A) stade indifférencié. Les deux systèmes de canaux sont présents : canaux de Müller (CM) et canaux de Wolff (CW). Ils se croisent, fusionnent et entrent en connexion avec le sinus urogénital (Sug). Chez les mammifères, le rein fonctionnel est le métanéphros (Met). (B) Différenciation du tractus femelle. Les canaux de Müller se maintiennent et se différencient en oviducte (partie supérieure des voies génitales), en corne utérine (C.ut) et partie supérieure du vagin (Va). (C) Différenciation du tractus mâle. Les canaux de Wolff donnent naissance au canal de l'épididyme, au canal déférent (Cd) qui est uniquement génital chez les mammifères, ce qui est différent des amphibiens où il est à la fois urinaire et génital, et aux vésicules séminales (Vs).

Epididyme (E), Gonades (G), Mésonéphros (Mes), Ovaire (O.), Prostate (P), Uretère (U), Uretère secondaire (U2), Vessie (V) (Modifié d'après Gallien L., 1973).

## 1) Différenciation du tractus mâle

Chez les mammifères, le testicule fœtal synthétise des hormones comme la testostérone, l'AMH et Insl3 (Leydig insulin like hormone).

### A) Synthèse de testostérone

La sécrétion d'androgènes par les cellules de Leydig est essentielle pour la masculinisation du fœtus. La testostérone est nécessaire au maintien des canaux de Wolff et à leur différenciation en épididyme, canal déférent et vésicule séminale (Fig.16).

### B) Synthèse d'AMH

L'AMH est la première hormone produite par les cellules de Sertoli. Chez la souris, elle est détectée 20 heures après le début de l'expression de Sry (Hacker A. *et al.*, 1995). Elle va diriger la régression des canaux de Müller chez les individus mâles.

L'AMH est une glycoprotéine homodimérique liée par un pont disulfure. Elle fait partie de la famille des TGFβ et agit à travers deux types de récepteur (type I et type II). Ces derniers sont des récepteurs serine / thréonine kinase possédant un domaine transmembranaire unique (Mishina Y. *et al.*, 1999).

#### *a) Expression de l'AMH*

Les analyses d'expression de l'AMH confirment sa présence dans les gonades mâles au moment de la régression des canaux de Müller. Chez les bovins mâles, l'AMH est détectable pendant la différenciation des tubules séminifères avec un pic au moment de la régression des canaux de Müller. Ce niveau d'expression est stable jusqu'à la naissance, puis il diminue (Vigier B. *et al.*, 1983). Les résultats sont similaires chez la souris, l'homme et le poulet (Munsterberg A. et Lovell-Badge R., 1991; Josso N. *et al.*, 1993; Eusebe D. *et al.*, 1996). Les études de délétion du gène de l'AMH chez des souris mâles confirment son implication dans la régression des canaux de Müller. En effet, cette mutation conduit au développement de pseudo-hermaphrodites avec la rétention des canaux de Müller (Behringer R.R. *et al.*, 1994). Il en est de même pour la mutation du récepteur de type II chez la souris (Mishina Y. *et al.*, 1996; Belville C. *et al.*, 1999). Chez l'homme, le syndrome de persistance des canaux de Müller peut être lié à un défaut de synthèse d'AMH ainsi qu'à une mutation du récepteur de type II de l'AMH (Imbeaud S. *et*

*al.*, 1995). Le récepteur de type I : Bmpr1a (Bone morphogenetic protein receptor) est aussi impliqué dans la régression des canaux de Müller puisque sa mutation mène à la persistance des oviductes et de l'utérus chez les individus génétiquement mâles (Jamin S.P. *et al.*, 2002). La voie de signalisation Wnt7a est importante pour activer l'expression du récepteur de l'AMH de type II. Chez des souris mâles $Wnt7a^{-/-}$, les dérivés des canaux de Wolff apparaissent normaux mais la régression des canaux de Müller échoue à cause de l'absence du récepteur de l'AMH (Miller C. et Sassoon D.A., 1998; Parr B.A. et McMahon A.P., 1998). La coopération des protéines SF1 et β-caténine conduit à l'activation du récepteur de type II de l'AMH *in vitro* (Hossain A. et Saunders G.F., 2003).

*b) Régulation de l'AMH*

L'activation initiale de l'AMH, à 12 jpc chez la souris, nécessite des éléments régulateurs proximaux situés à environ 370 pb en amont du site de transcription tandis que le maintien de l'expression de l'AMH jusqu'à la puberté nécessite des éléments de réponse plus en amont (Beau C. *et al.*, 2001).

La régulation de l'expression de l'AMH dans les gonades mâles est assez bien décrite et implique l'interaction de plusieurs protéines. L'analyse du promoteur a révélé des sites de liaison pour la protéine SF1 et la mutation de ces sites abolit l'expression de l'AMH (Shen W.H. *et al.*, 1994). La protéine SF1 active la transcription de l'AMH à la fois *in vivo* (Giuili G. *et al.*, 1997) et *in vitro* (Barbara P.S. *et al.*, 1998). Au cours de cette activation, SF1 coopère avec la protéine WT1(-KTS). DAX-1 antagonise cette association à travers une interaction directe avec la protéine SF1 (Nachtigal M.W. *et al.*, 1998). Le promoteur de l'AMH contient aussi un élément de réponse GATA très conservé. L'expression dimorphique de Gata-4 fait de lui un régulateur potentiel de l'AMH (Viger R.S. *et al.*, 1998). En effet, la protéine SF1 peut interagir directement avec la protéine GATA-4 pour réguler la transcription de l'hormone antimüllerienne (Tremblay J.J. et Viger R.S., 1999). La protéine DAX-1 antagonise cette coopération entre GATA-4 et SF1 (Tremblay J.J. et Viger R.S., 2001). Une mutation G35E dans le gène SF1 humain cause l'inversion sexuelle d'individus génétiquement mâles. En fait, SF1 n'agit plus en synergie avec la protéine GATA-4 en dépit d'une interaction physique directe entre les deux protéines (Tremblay J.J. et Viger R.S., 2003). Dans l'ovaire fœtal, la protéine FOG2 est capable de réprimer l'effet de GATA-4 sur l'activation de l'AMH *in vitro* (Anttonen M. *et al.*, 2003). La protéine SOX9 active aussi le promoteur de l'AMH *in vitro* (De Santa Barbara P. *et al.*, 1998). Elle coopère avec la protéine SF1 pour réguler l'expression de

l'AMH. SOX9 et SF1 interagissent directement via le domaine de liaison à l'ADN de SOX9 et la région C-terminale de SF1. SOX9 semble jouer un rôle essentiel dans l'initiation de la transcription de l'AMH puisque des mutations au niveau du site de liaison pour ce gène dans le promoteur de l'AMH entraînent des cas de pseudo-hermaphrodisme (Arango N.A. *et al.*, 1999). Chez le poulet et l'alligator, l'AMH est exprimée avant la protéine SOX9 ce qui exclut la possibilité de la régulation de cette hormone par SOX9 (Oreal E. *et al.*, 1998; Smith C.A. *et al.*, 1999c; Western P.S. *et al.*, 1999b). Toutefois, des sites de liaison SOX existent au niveau du promoteur de l'AMH chez le poulet (Oreal E. *et al.*, 1998). Récemment, un autre gène de la famille SOX, SOX8, dont l'expression commence juste avant celle de l'AMH dans les gonades mâles de souris, a été étudié. La protéine SOX8 peut se lier sur les sites de liaison SOX dans le promoteur proximal de l'AMH et comme SOX9, peut interagir avec la protéine SF1. Ainsi, SOX8 pourrait se substituer à la protéine SOX9 quand cette dernière est exprimée trop tard (Schepers G. *et al.*, 2003). Cependant, Sox8 ne présente pas un profil d'expression dimorphique chez le poulet et la tortue *Trachemys scripta* (Takada S. et Koopman P., 2003).

C) Synthèse d'Insl3

Insl3, l'autre hormone synthétisée par le testicule, appartient à la famille des hormones peptidiques et contrôle la descente testiculaire dans le scrotum (Adham I.M. *et al.*, 1993; Zimmermann S. *et al.*, 1997). L'hormone Insl3 mature est composée de deux chaînes A et B liées par un pont disulfure (Adham I.M. *et al.*, 1993). Des délétions de ce gène chez des souris montrent qu'il est essentiel pour la croissance et la différenciation du gubernaculum et qu'il dirige la descente testiculaire intra abdominale. En effet, des souris mâles $Insl3^{-/-}$ sont viables mais stériles du fait d'une spermatogenèse anormale et présentent un défaut de développement du gubernaculum durant l'embryogenèse (Zimmermann S. *et al.*, 1999; Nef S. et Parada L.F., 1999). L'analyse de la région 5' du gène Insl3 a révélé la présence de trois sites de liaison pour la protéine SF1 exigés pour l'activation de la transcription (Zimmermann S. *et al.*, 1998). Insl3 se lie sur un récepteur couplé à une protéine G : GREAT, un récepteur transmembranaire dont la mutation empêche la différenciation du gubernaculum et la descente intratesticulaire (Bogatcheva N.V. *et al.*, 2003; Gorlov I.P. *et al.*, 2002). La production de souris transgéniques femelles déficientes pour GREAT mais surexprimant Insl3 a démontré que GREAT est le récepteur unique de Insl3 puisqu'elles présentent un phénotype normal (Bogatcheva N.V. *et al.*, 2003).

## 2) Différenciation du tractus femelle

Dans le tractus femelle, les ovaires en différenciation ne synthétisent pas d'AMH, ce qui permet le maintien des canaux de Müller. La gonade femelle ne produit pas de testostérone, ce qui occasionne la dégénérescence des canaux de Wolff. Au cours de la différenciation du tractus femelle, les canaux de Müller se différencient en oviducte, utérus et partie supérieure du vagin sous l'influence des œstrogènes (Fig.16).

Wnt4 est exigé aux stades précoces du développement des canaux de Müller puisque ces derniers sont absents chez les souris $Wnt4^{-/-}$ (Vainio S. *et al.*, 1999). D'autres gènes sont impliqués dans la formation et la différenciation des canaux de Müller comme Lim1, Pax-2, Pax-8, Wnt7a (Kobayashi A. et Behringer R.R., 2003; Torres M. *et al.*, 1995; Miller C. et Sassoon D.A., 1998).

# V) Le modèle : *Pleurodeles waltl*

*Pleurodeles waltl* est un amphibien urodèle de la famille des salamandridés. Son aire de répartition est localisée sur le pourtour de la Méditerranée. Son utilisation comme modèle expérimental remonte aux années 1950. Les animaux, élevés dans des bacs contenant de l'eau courante à température ambiante, se reproduisent très bien en laboratoire, de septembre à avril.

## 1) Développement morphologique et différenciation histologique des gonades

Après la fécondation, le développement embryonnaire dure environ deux semaines, jusqu'à l'éclosion au stade 35 (Fig.17). La prise de nourriture débute au stade 38. Les animaux sont d'abord nourris avec des artémies puis avec des larves de chironomes. Le développement larvaire s'achève au stade 56, fin de la métamorphose marquée par la première mue de l'animal. Dès lors, l'alimentation est complétée par du cœur de bœuf haché, des moules et des vers de farine. Le stade juvénile est assez long (8 mois au minimum) et la maturité sexuelle est atteinte entre 12 et 18 mois.

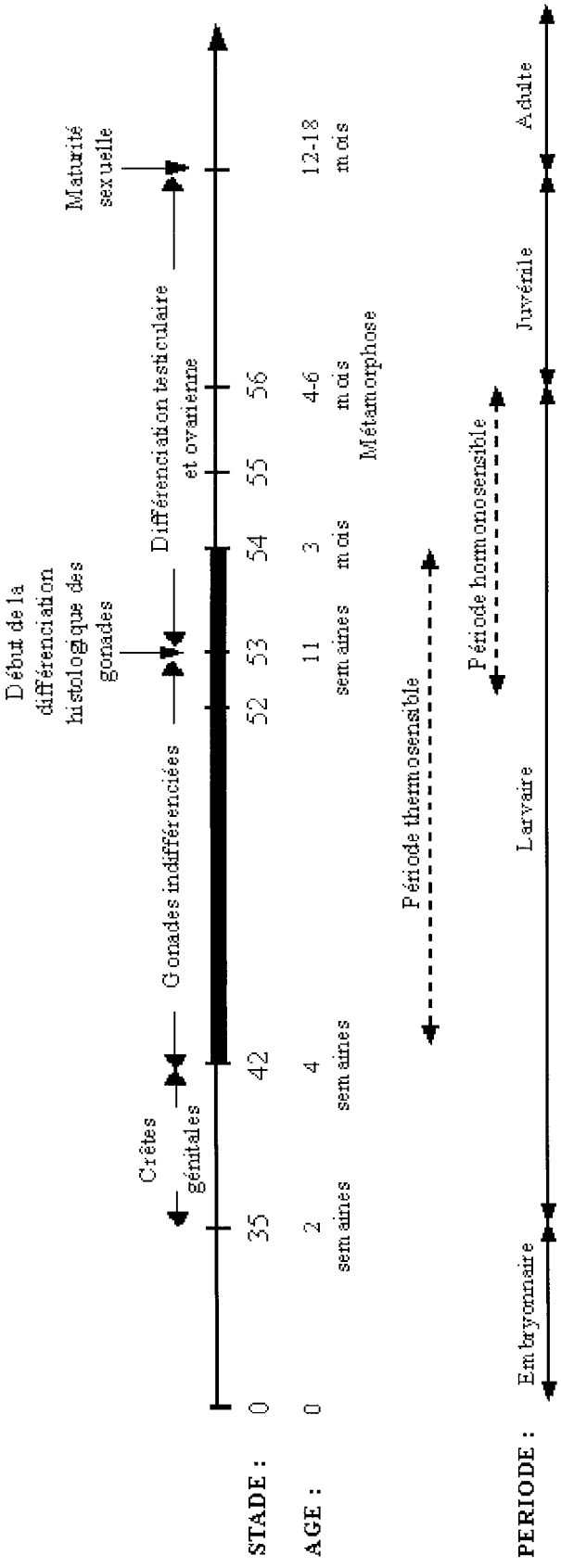



**Figure 17 :** Axe de développement de *Pleurodeles waltl*.

L

es différents stades du développement ont été définis par des critères morphologiques et sont répertoriés dans une table (Gallien L. et Durocher M., 1957). Les illustrations présentées (Fig.18) ne concernent que les stades 42 à 56, puisque pendant la thèse, le travail a principalement porté sur cette période au cours de laquelle survient la différenciation gonadique. Les stades de cette période sont pour la plupart déterminés par le nombre de doigts présents au niveau des membres antérieurs et postérieurs (Fig.18). Les larves sont assez petites : leur taille varie entre 1,5 cm pour le stade 42 et 7 cm pour le stade 56.

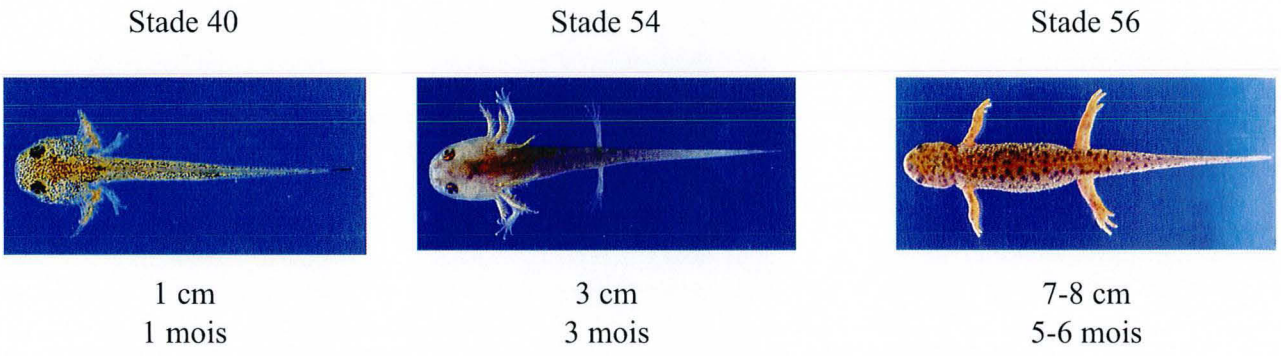



**Figure 18 : Photographies de larves prises à différents stades du développement**. Le stade des larves ainsi que leur taille et leur âge sont indiqués au dessus et en dessous de la photographie respectivement (D'après Shi D.L. et Boucaut J.C., 1995).

Du point de vue histologique, les crêtes génitales se forment aux stades 35 à 43. L'ébauche gonadique n'est qu'une crête proche du blastème mésonéphrétique où sont localisées les cellules germinales primordiales. Ces dernières débutent leur prolifération à la fin du stade 41 (Dournon C. *et al.*, 1989). Aux stades 44 et 45, les éléments somatiques médullaires se mettent en place et la gonade sexuellement indifférenciée se constitue. A ce moment, toute agénésie mésonéphrétique entraîne une agénésie de la partie médullaire des gonades se traduisant par une dégénérescence des cellules germinales (Houillon C., 1956). Les gonades restent indifférenciées jusqu'au stade 52 (Fig.19). Le premier signe de la différenciation morphologique des gonades n'est observé qu'au stade 53 par analyse histologique. Durant la différenciation ovarienne, les cellules germinales primordiales (CGP) se localisent à la périphérie de la gonade tandis qu'elles quittent le cortex pour coloniser la medulla pendant la différenciation testiculaire (Fig.19). Chez la femelle, la différenciation sexuelle, aux alentours de la métamorphose, aboutit à la formation d'un ovaire creux résultant de la dégénérescence médullaire. Au contraire, chez le mâle, elle conduit à la formation d'un testicule cystique dont le cortex réduit participe à l'élaboration

de l'albuginée (Fig.19). A ce stade, on distingue en plus à côté de chaque gonade, un corps gras (CG) (Fig.19).

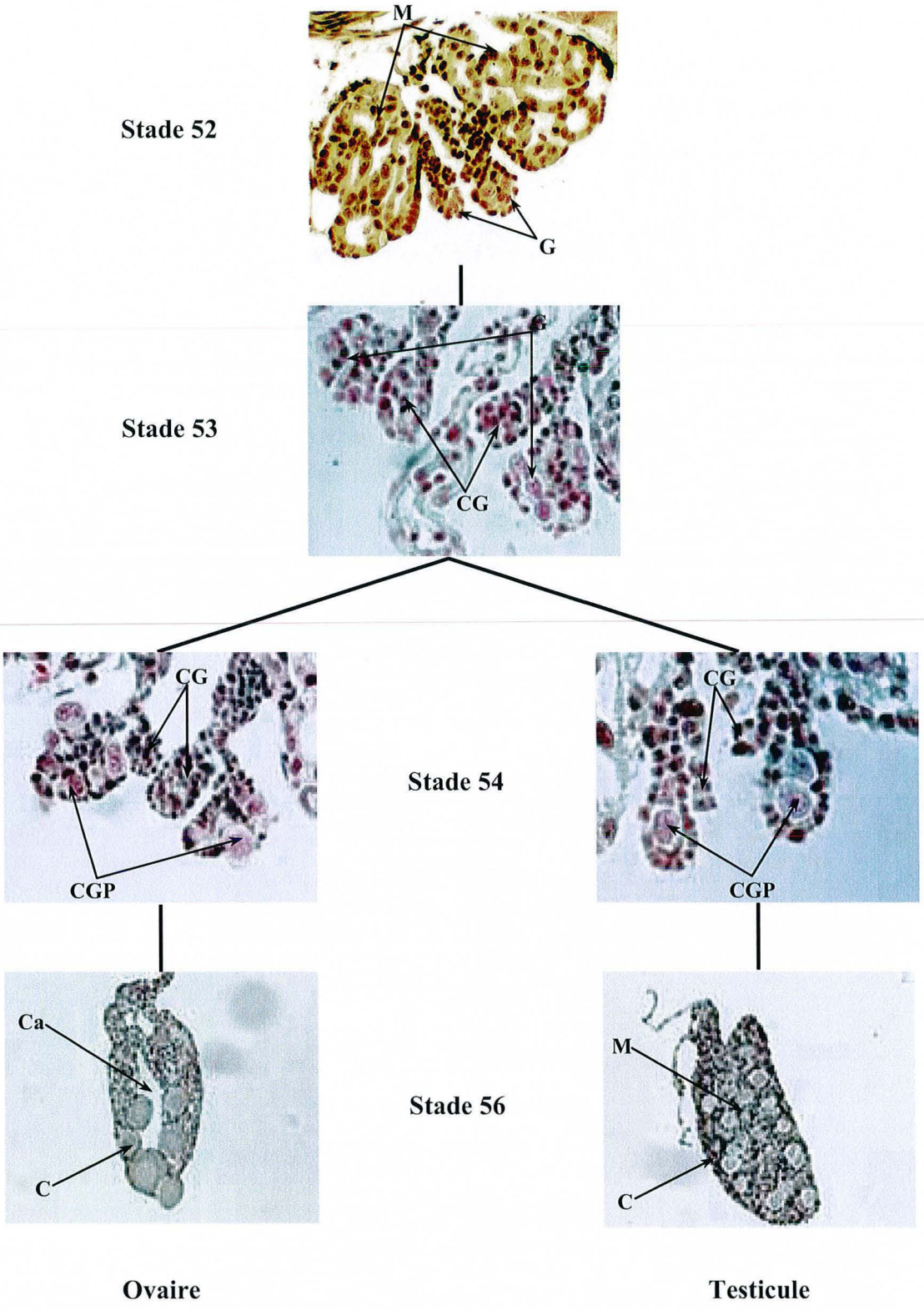



**Figure 19 : Coupes histologiques de gonades à différents stades du développement.** Nous observons : les gonades (G), le mésonéphros (M), les cellules germinales primordiales (CGP), le corps gras (CG), le cortex (C), la medulla (M) et al cavité ovarienne (Ca) (G= x400).

## 2) La détermination du sexe

Le pleurodèle présente un déterminisme génétique du sexe de type ZZ/ZW. A 20°C, le phénotype sexuel est conforme au sexe génétique et conduit à une sex-ratio de 1:1. L'analyse de descendances d'individus traités par des œstrogènes a permis de démontrer l'homogamétie mâle (ZZ) (Gallien L., 1954a; Gallien L., 1950; Gallien L., 1951). En effet, des larves génétiquement mâles ZZ se développent en femelles phénotypiques après l'application de benzoate d'œstradiol pendant la vie larvaire. Ces néofemelles ZZ, croisées avec un mâle standard ZZ, conduisent à une descendance monogénique mâle ZZ (Gallien L., 1951). L'hétérogamétie femelle (ZW) a été confirmée après l'analyse de descendances d'individus ayant subi des greffes embryonnaires de mésoderme intermédiaire prélevé au stade 24 (Collenot A., 1973). Une gonade primordiale de femelle ZW greffée chez un individu mâle ZZ se développe en un testicule fonctionnel. Ainsi, l'animal receveur du greffon contient une gonade mâle ZW et son croisement avec une femelle standard ZW présente, parmi leurs descendants, des femelles dites thélygènes WW. Ces dernières croisées avec des mâles standards (ZZ) donnent une descendance monogénique femelle ZW (Collenot A., 1973). Des cas d'inversions sexuelles spontanées ont été observés dans des conditions d'élevage normales (Collenot A. *et al.*, 1994). Des individus mâles, quelques femelles et des intersexués possédant un génotype ZZ ont été observés. L'analyse de la descendance après le croisement de ces individus entre eux est entièrement ZZ avec présence de mâles, de femelles et d'intersexués. Donc, cette inversion complète ou partielle est transmise à la génération suivante et donc probablement plusieurs gènes sont impliqués dans le processus de féminisation de ces individus ZZ (Collenot A. *et al.*, 1994).

Le caryotype mitotique réalisé sur des larves de pleurodèle à partir de chromosomes en prométaphase a révélé 12 paires de chromosomes (Gallien L. *et al.*, 1965). Cependant, l'analyse morphologique de tous les chromosomes d'une plaque métaphasique n'est pas toujours facile et les chromosomes sexuels mitotiques ne présentent pas d'hétéromorphisme. Aussi, une étude des chromosomes méiotiques d'ovocytes de femelles adultes a été entreprise (Gallien L. *et al.*, 1966). L'analyse de ces chromosomes en écouvillon montre des expansions latérales ou boucles de transcription de morphologies différentes. L'établissement de la carte cytogénétique des chromosomes en écouvillon a été défini par le classement de la morphologie et de la taille des boucles (Lacroix J.C., 1968). L'utilisation d'un anticorps monoclonal comme nouveau marqueur des boucles a révélé l'hétéromorphisme du bivalent IV (Lacroix J.C. *et al.*, 1985). Une température de 36,5°C

conduit au développement d'autres marqueurs, des boucles géantes observées après 18 heures d'exposition, alors que sous les conditions normales, les boucles sont influencées par le génotype sexuel (Lacroix J.C. *et al.*, 1990). Les analyses des boucles hétéromorphiques ont montré que le bivalent IV correspond aux chromosomes sexuels Z et W (Lacroix J.C. *et al.*, 1990). Un autre marquage spécifique du segment différentiel du chromosome W a été obtenu par hybridation *in situ* avec des sondes ARN. Ces sondes ARN semblent se fixer sur des protéines spécifiques du chromosome W (Penrad-Mobayed M. *et al.*, 1998). L'analyse de femelles trisomiques ZZW fertiles a démontré que le chromosome sexuel W joue un rôle dominant dans la détermination sexuelle femelle (Lacroix J.C., 1967; Lacroix J.C. *et al.*, 1990). Cependant, l'obtention de néofemelles ZZ et de néomâles ZW fertiles suggère que les facteurs contrôlant la spermatogenèse et l'ovogenèse sont autosomaux et ne sont pas localisés sur la région déterminante du chromosome W.

Depuis les années 1980, le génotype sexuel peut être déterminé plus simplement par l'analyse du profil électrophorétique de la peptidase-1. Cette enzyme dimérique est codée par deux gènes codominants liés aux chromosomes sexuels. Le gène peptidase A est lié au chromosome Z et le gène peptidase B ou β est lié au chromosome W (Ferrier V. *et al.*, 1983). Ce gène s'exprime dans tous les tissus et le sexage des larves peut être réalisé aisément à partir d'une biopsie caudale (Fig.20).

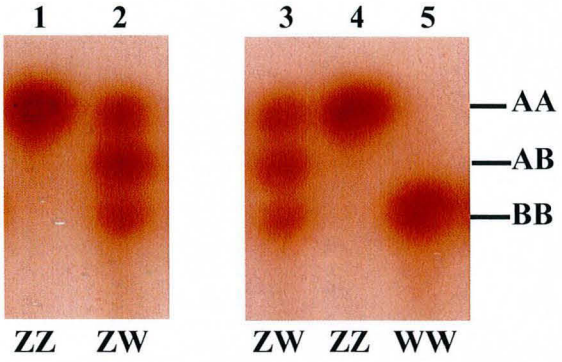



**Figure 20 : Profil électrophorétique sur gel d'amidon de l'enzyme peptidase-1, enzyme liée au sexe.** La présence de dimères AA est caractéristique d'un génotype mâle $Z_AZ_A$ (piste1). La présence de dimères AA, AB ou BB est typique d'un génotype femelle $Z_AW_B$ (piste 2). L'enzyme est également un excellent marqueur du génotype sexuel pour les animaux inversés sexuellement. Ainsi, piste 3, on peut observer un néomâle ZW obtenu par augmentation de la température d'élevage. La piste 4 correspond à une néofemelle ZZ obtenue après un traitement au benzoate d'œstradiol. Enfin, la piste 5 correspond à une femelle thélygène $W_BW_B$ obtenue par croisement entre une femelle standard ZW et un néomâle ZW.

### 3) Modification de la différenciation sexuelle

Malgré ce déterminisme génétique, la différenciation du sexe peut être modifiée par des facteurs environnementaux comme la température d'élevage ou par la présence dans l'eau d'élevage d'hormones stéroïdes sexuelles.

#### A) Influence de la température

L'élevage des larves de pleurodèles à une température de 30 à 32°C entraîne une modification de la sex-ratio en faveur du sexe mâle (Dournon C. et Houillon C., 1984). Ces températures élevées entraînent une réduction de la longueur totale des larves et une accélération du développement larvaire uniquement à 30°C (Dournon C. et Houillon C., 1985). La sensibilité de la différenciation sexuelle à l'action de la température est variable selon les individus. Les conditions optimales permettant d'obtenir une inversion de la totalité des femelles génétiques ont été définies (Dournon C. et Houillon C., 1985). A 30°C, un traitement commencé au stade 43 doit être poursuivi jusqu'à la métamorphose pour être efficace (70% d'inversion sexuelle) alors qu'à 31°C ou 32°C, le traitement est totalement efficace lorsqu'il est appliqué du stade 43 au stade 54. Cependant, ce dernier est sans effet, même s'il est commencé tôt (stade 40), et interrompu au stade 50. Des traitements commencés tardivement (au stade 50) sont toujours inefficaces à 30°C mais inversent certains individus à 32°C. Ainsi, l'inversion complète de toutes les femelles ZW est obtenue lors d'un élevage à 32°C du stade 42 au stade 54. Cette période dite thermosensible dure deux mois : de la gonade indifférenciée au début de la différenciation sexuelle histologique. Les néomâles ZW ainsi obtenus sont fertiles et, croisés avec une femelle ZW, ils permettent d'obtenir des femelles WW. Celles-ci croisées avec un mâle ZZ donnent une descendance totalement femelle ce qui constitue pour nos études un matériel de choix.

#### B) Influence des hormones stéroïdes sexuelles

Les hormones stéroïdes sexuelles peuvent modifier la différenciation sexuelle. Elles ont une action plus tardive par rapport à la température : la période hormonosensible s'étend du stade 52 au stade 56 (Fig.17). L'utilisation de stéroïdes chez le pleurodèle a montré que la production d'œstradiol est importante pour la différenciation femelle. En effet, le traitement de larves au benzoate d'œstradiol conduit à une féminisation des individus génétiquement mâles ZZ (Gallien L., 1954b), alors que la testostérone ne

masculinise pas les femelles ZW mais féminise des larves génétiquement mâles ZZ (Gallien L., 1962). Cet effet paradoxal a également été observé chez les reptiles dont le déterminisme du sexe est sensible à la température (Pieau C., 1974). Il est expliqué par l'aromatisation des androgènes en œstrogènes. La production d'œstrogènes semble être une cible directe ou indirecte de la température puisque l'œstradiol abolit l'effet masculinisant de la température (Zaborski P., 1986).

Cependant, la présence du testicule inhibe le développement ovarien lors d'associations hétérosexuées, de greffes d'ébauches gonadiques ou d'abdomen de sexe mâle sur le flanc d'un embryon femelle (Collenot A. *et al.*, 1977). L'inhibition ovarienne se traduit au niveau du cortex par la disparition des gonocytes. Le sac ovarien est rarement distinct et les cellules de la medulla restent groupées en un amas compact et allongé au centre de la gonade. Chez des chimères à corps double, l'inhibition ovarienne se manifeste avec des degrés très divers selon la position antérieure ou postérieure des ovaires par rapport au testicule : l'effet est plus significatif lorsque l'ovaire est en position antérieure par rapport au testicule (Houillon C. et Dournon C., 1986). Les mêmes observations ont été réalisées sur des parabioses (Livre Gallien, 1973). Cet effet inhibiteur a également été observé chez d'autres amphibiens (Humphrey R.R., 1945; Mikamo K. et Witschi E., 1963). L'action inhibitrice exercée par le testicule peut être qualifiée d'effet free martin comme celui observé chez les mammifères bovidés (Lillie F.R., 1916; Lillie F.R., 1917). Le testicule embryonnaire des amphibiens semble être le siège de la sécrétion endocrine d'une substance qui est capable de modifier le cours de la différenciation ovarienne. Les hormones stéroïdes mâles pourraient éventuellement être impliquées dans ce processus.

Afin de vérifier si l'effet des stéroïdes observé lors des différents traitements correspond bien à une production endogène de stéroïdes dans la gonade en différenciation, une enzyme importante de la chaîne de biosynthèse des hormones stéroïdes : la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3βHSD) a été étudiée. L'analyse histochimique a révélé la présence de la 3βHSD dans les gonades indifférenciées des deux sexes dès le stade 44 (Collenot G. et Collenot A., 1977). Cette enzyme est active dans les gonades de larves ZZ et ZW avant le début de la différenciation sexuelle, démontrant que la synthèse d'hormones stéroïdes a déjà commencé dans la gonade histologiquement indifférenciée.

### 4) L'aromatase et la différenciation gonadique femelle

Comme chez les autres vertébrés non mammaliens, les œstrogènes et l'aromatase

sont impliqués dans la différenciation ovarienne chez *Pleurodeles waltl*. Les mesures de l'activité aromatase ont montré des différences selon le devenir sexuel des gonades. A température ambiante, lorsque la différenciation des gonades est conforme au sexe génétique, l'activité aromatase est faible au stade 47 chez les individus mâles et femelles. Au stade 52, avant la différenciation histologique des gonades, l'activité aromatase augmente chez les larves ZW. Après ce stade, elle continue d'augmenter chez les femelles ZW tandis qu'elle reste faible chez les larves ZZ (Chardard D. *et al.*, 1995). Donc, la différenciation ovarienne est corrélée à une haute activité aromatase suggérant que l'enzyme est impliquée, comme chez les reptiles ou les oiseaux, dans le processus de différenciation sexuelle. Le traitement de mâles génétiques avec de l'œstradiol conduit à une augmentation de l'activité aromatase en corrélation avec la différenciation femelle tandis que l'exposition à un inhibiteur d'aromatase (le fadrozole) conduit à une diminution de l'activité enzymatique en corrélation avec le développement mâle (Chardard D. et Dournon C., 1999). Il a été suggéré que la température agit en amont, en réprimant directement ou indirectement la production d'œstrogènes, puisque l'œstradiol abolit l'effet masculinisant d'une température élevée (Zaborski P., 1986). L'aromatase semble être en effet la cible de la température puisque l'élevage de larves ZW à 32°C pendant la période thermosensible conduit à une diminution de l'activité aromatase au niveau de celle des larves ZZ (Chardard D. *et al.*, 1995). L'exposition de larves ZW à 32°C pendant 48 heures entraîne une diminution de l'activité aromatase si le traitement a lieu au stade 53. Un traitement similaire réalisé aux stades 55 ou 56 n'a pas d'effet, indiquant que la température agit sur la régulation de l'aromatase pendant la période thermosensible (Chardard D. *et al.*, 1995).

## VI) Objectif de l'étude

Le but de ces quatre années de thèse a consisté en l'analyse de la cascade génique de la détermination et différenciation sexuelle chez *Pleurodeles waltl*. Ce modèle d'étude présente un intérêt puisqu'il possède les deux types de détermination GSD et TSD : l'augmentation de la température d'élevage pendant une période critique du développement larvaire induisant une modification du déterminisme génétique du sexe .

La première partie du travail a porté sur l'analyse de l'enzyme clé de la différenciation ovarienne : l'aromatase. Chez le pleurodèle, comme chez la plupart des vertébrés, l'aromatase joue un rôle central dans la différenciation ovarienne : son activité augmente au cours de la différenciation femelle au moment où les premiers signes de la différenciation histologique sont détectables. Comme nous ne disposions d'aucune information au niveau transcriptionnel, nous avons dans un premier temps cloné le gène de l'aromatase. Puis son expression a été analysée au cours de la différenciation gonadique afin de savoir si cette augmentation d'activité était corrélée à une augmentation de transcrits aromatase. Cette étude a été par la suite étendue aux autres tissus stéroidogéniques et en particulier au cerveau. Comme les facteurs environnementaux ou les œstrogènes exogènes peuvent perturber la différenciation ovarienne, nous avons supposé que le cerveau pourrait agir comme relais en contrôlant la différenciation sexuelle gonadique en réponse à un stimulus externe.

En seconde partie, nous avons étudiés d'autres gènes susceptibles d'agir en amont de l'aromatase, puisque son rôle est assez tardif chez le pleurodèle. Ces gènes pourraient être impliqués dans l'activation de l'aromatase au cours de la différenciation ovarienne et constituer une cible de la température. Pour ce faire, nous avons recherché et analysé l'expression de gènes connus chez d'autres modèles pour participer à la différenciation de type TSD ou GSD. Ainsi, Sf1, Sox9 et Dmrt1 ont été clonés et leur expression au cours du développement a été étudiée. Enfin, nous avons initié une recherche de gènes exprimés différentiellement au cours de la période thermosensible en construisant une banque d'expression par soustraction. Pour ce faire des larves ZW soumises ou non à l'effet de la température ont été utilisées. L'analyse de cette banque différentielle a seulement débuté.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse est présenté sous forme d'articles. Les derniers travaux dont les résultats ne sont pas encore suffisants pour une soumission ont été rédigés en français. Chaque partie sera précédée d'une introduction brève situant les principales données décrites chez les autres espèces. Enfin, tous les résultats obtenus seront discutés dans le dernier chapitre «conclusions et perspectives».

# RESULTATS

# RESULTATS

## I. L'aromatase et la différenciation sexuelle chez *Pleurodeles waltl*

### 1) Etude de l'expression de l'aromatase au cours de la différenciation gonadique

(«Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*» Kuntz S. *et al.*, 2003)

#### A) Introduction

L'aromatase est une enzyme clé de la différenciation sexuelle chez les vertébrés non mammaliens. L'activité de cette enzyme ainsi que le niveau de ses transcrits augmentent au cours de la différenciation ovarienne chez les poissons, les reptiles TSD et le poulet (Guiguen Y. *et al.*, 1999; Desvages G. et Pieau C., 1992; Smith C.A. et Joss J.M., 1994b; Smith C.A. *et al.*, 1995; Elbrecht A. et Smith R.G., 1992; Yoshida K. *et al.*, 1996; Smith C.A. *et al.*, 1997). Chez la tortue *Malaclemys terrapin*, le niveau des transcrits aromatase augmente dans les gonades à température féminisante tandis qu'il reste faible à température masculinisante (Jeyasuria P. et Place A.R., 1997). De même, la masculinisation de femelles génétiques par l'augmentation de la température d'élevage est due à une répression de l'expression de l'aromatase chez deux espèces de poissons : le tilapia et *Paralichthys olivaceus* (D'Cotta H. *et al.*, 2001b; Kitano T. *et al.*, 1999).

Chez *Pleurodeles waltl*, la différenciation ovarienne est corrélée à une activité aromatase élevée (Chardard D. *et al.*, 1995). L'activité est faible au début de la TSP puis augmente exponentiellement chez les larves femelles ZW à partir du stade 52, tandis qu'elle reste faible chez les larves ZZ (Chardard D. *et al.*, 1995). Afin de comprendre comment est régulée cette fonction chez le pleurodèle, il était important de compléter ces résultats par une analyse d'expression de l'aromatase au cours de la différenciation gonadique chez des larves mâles ZZ et femelles ZW élevées à 20°C ($ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$). Chez les larves ZW élevées à 32°C pendant toute la période thermosensible ($ZW^{32}$), l'activité aromatase diminue au niveau de celle des mâles $ZZ^{20}$ (Chardard D. *et al.*, 1995). Nous avons donc testé l'hypothèse d'une régulation de l'expression de l'aromatase par la température afin d'expliquer les différences observées lors des mesures d'activité enzymatique.

B) Principaux résultats

Afin de pouvoir entreprendre ces études d'expression, le gène de l'aromatase a tout d'abord été isolé par des techniques de PCR dégénérée et RACE-PCR à partir d'ADNc d'ovaire ou de testicule adulte. L'ADNc aromatase obtenu contient une phase de lecture complète et la comparaison de la séquence des acides aminés déduite montre un haut degré de conservation avec celles d'autres espèces de vertébrés.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de l'aromatase dans différents tissus adultes : cœur, foie, rein, intestin, rate, cerveau, testicule et ovaire. Un fragment de chacun de ces organes a été prélevé et analysé par RT-PCR qualitative (35 cycles). Après l'hybridation, un signal a été détecté dans le cerveau, l'ovaire et le testicule, ce qui est cohérent avec les données observées chez d'autres espèces.

L'analyse a ensuite été poursuivie par l'étude de l'expression de l'aromatase au cours du développement. Nous avons commencé par définir la localisation des transcrits aromatase par hybridation *in situ* (collaboration avec l'équipe du docteur Duterque-Coquillaud – CNRS Lille). Cette étude a été réalisée au stade 54, moment où l'activité aromatase est plus importante chez les larves $ZW^{20}$ que chez les larves $ZZ^{20}$ (Fig.21). Des transcrits aromatase ont ainsi été détectés chez les larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$. Ces transcrits sont spécifiquement localisés dans la gonade et non pas dans le corps gras qui l'entoure, ni dans le mésonéphros. Ainsi, toutes les études suivantes de RT-PCR ont été réalisées sur des complexes gonades-mésonéphros puisqu'il est difficile de dissocier le mésonéphros de la gonade avant le stade 55. Nous pouvons aussi noter que le signal détecté dans les gonades des larves $ZW^{20}$ est plus important que celui observé chez les larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{32}$. Ce résultat sera confirmé par RT-PCR semi-quantitative.

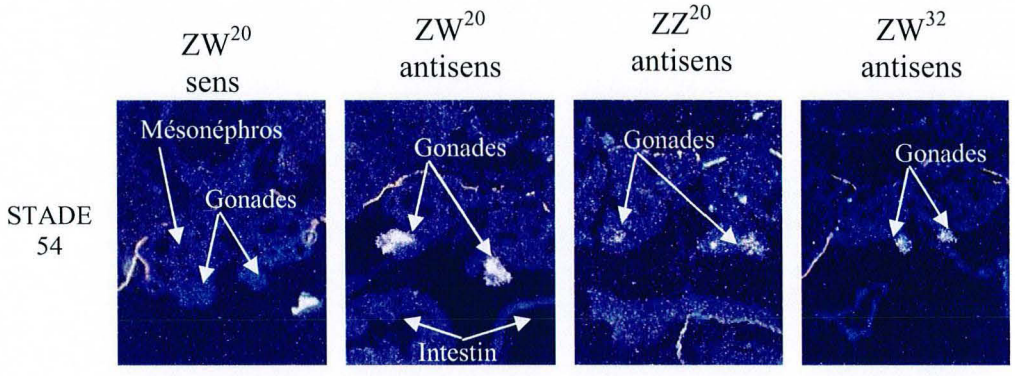



**Figure 21 : Localisation des transcrits aromatase par hybridation *in situ*.** Des coupes de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ au stade 54 ont été hybridées avec une sonde ARN antisens aromatase. Une sonde sens a été utilisée comme témoin sur des coupes de larves $ZW^{20}$. Les transcrits aromatase sont détectés dans les gonades des trois types de larves avec aucun signal ni dans le mésonéphros, ni dans l'intestin (G= x330).

Nous avons ensuite étudié l'expression de l'aromatase au cours de la période thermosensible. Des complexes gonades-mésonéphros ont été prélevés sur des larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ à différents stades de la période thermosensible : 42, 44, 46, 48, 50, 52 et au stade 54. Chaque échantillon est constitué d'un complexe gonades-mésonéphros d'un seul individu et a été analysé par RT-PCR qualitative (35 cycles). L'étude a révélé la présence de transcrits aromatase très tôt, dès le stade 44, chez les trois types de larves. Cette expression est ensuite maintenue chez toutes les larves jusqu'au stade 54, dernier stade étudié.

Dans la dernière partie de l'étude, nous avons déterminé si l'augmentation de l'activité aromatase observée à partir du stade 52 chez les larves $ZW^{20}$ (Chardard D. *et al.*, 1995) est corrélée à une augmentation du niveau de transcrits aromatase. Pour ce faire, une RT-PCR semi-quantitative (26 cycles) a été réalisée sur des larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ aux stades 52 et 54 (Fig.22A). Au stade 52, le niveau observé chez les larves $ZW^{20}$ n'est pas significativement différent de celui des larves $ZZ^{20}$. Cependant, au stade 54, le niveau de transcrits aromatase augmente chez les larves femelles $ZW^{20}$ en accord avec les mesures d'activité aromatase. La différence dans le niveau de transcrits entre les larves $ZW^{20}$ et les larves $ZZ^{20}$ est d'un facteur 1,5 alors qu'il est de 40 pour l'activité aromatase. Cela suggère que des mécanismes de régulation post-transcriptionnels sont impliqués.

Enfin, nous avons analysé l'effet de la température sur le niveau de transcrits aromatase (Fig.22B). En effet, il a été montré que l'activité aromatase diminue chez les larves $ZW^{32}$ (Chardard D. *et al.*, 1995). L'analyse a aussi été réalisée par RT-PCR semi-quantitative (26 cycles) au stade 54, au moment où le niveau de transcrits est significativement plus important chez les larves $ZW^{20}$. Un lot de larves ZW a été élevé à 32°C pendant toute la période thermosensible tandis que le lot témoin de larves ZZ et ZW est maintenu à 20°C. De plus, un autre lot de larves ZW a subi un choc thermique de 48 heures à 32°C après la période thermosensible (après le stade 54). Les résultats démontrent une chute de l'expression de l'aromatase en réponse à une élévation de la température. Le ratio aromatase / Gapdh chez les larves $ZW^{32}$ est réduit à un niveau qui n'est pas significativement différent de celui observé chez les larves $ZZ^{20}$. L'augmentation de la température d'élevage après la période thermosensible n'a pas d'effet sur la transcription du gène aromatase démontrant que le traitement thermique doit être effectué pendant la TSP pour induire l'inversion sexuelle.

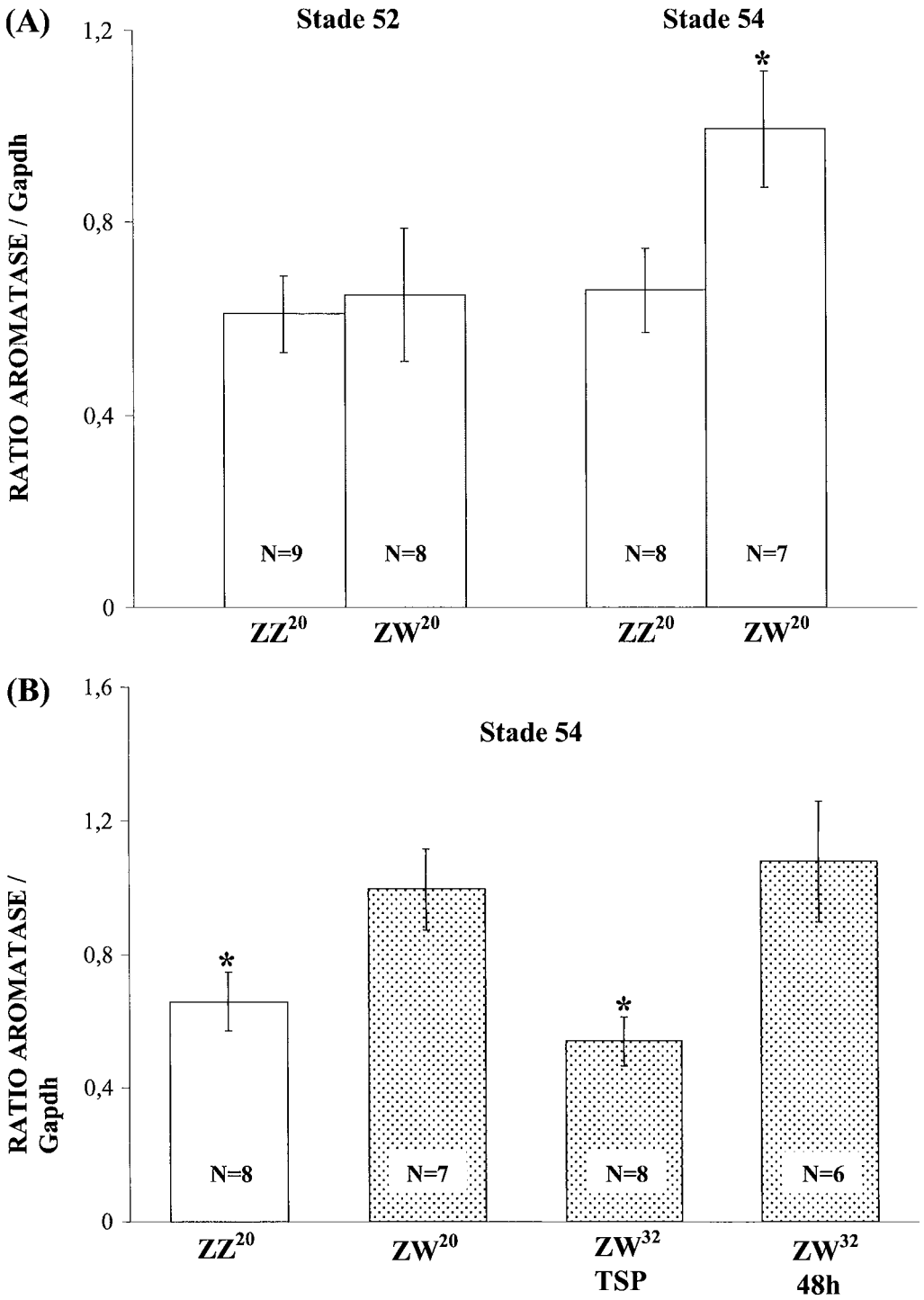



Figure 22 : Quantification de l'expression de l'aromatase dans les complexes gonades-mésonéphros chez des larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$, aux stades 52 et 54. Les ARNs totaux d'un complexe gonades-mésonéphros ont été extraits, rétrotranscrits puis amplifiés par PCR semi-quantitative (26 cycles). Après hybridation, l'intensité du signal aromatase a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. La moyenne des rapports est présentée sur l'histogramme. L'écart-type moyen est présenté par une barre. Le nombre de répétitions est indiqué par N. *, $P<0,05$ *vs.* $ZW^{20}$. (A) Etude de l'expression de l'aromatase chez les larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ aux stades 52 et 54. (B) Effet de la température sur l'expression de l'aromatase, étudié au stade 54, sur des larves ZW élevées à 32°C pendant toute la période thermosensible ($ZW^{32}$ TSP) et sur des larves ZW chauffées à 32°C pendant 48 heures ($ZW^{32}$ 48h).

C) Conclusion

Au cours de cette étude, l'ADNc de l'aromatase a été isolé chez *Pleurodeles waltl*. Chez les animaux adultes, l'aromatase est principalement présente dans le cerveau, le testicule et l'ovaire. Au cours du développement, elle est spécifiquement localisée dans les gonades et son expression débute au stade 44. Comme cela avait été suggéré par l'analyse par hybridation *in situ*, l'analyse par RT-PCR semi-quantitative a montré une augmentation significative du niveau de transcrits aromatase durant la différenciation ovarienne au stade 54. Cependant cette différence entre les larves $ZW^{20}$ et $ZZ^{20}$ ne reflète pas celle de l'activité aromatase, suggérant que cette enzyme est à la fois régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. De plus, nous avons démontré que la température peut induire une diminution du niveau de transcrits aromatase seulement lorsque le traitement thermique est effectué pendant la période thermosensible.

## * Article 1

PERGAMON

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 84 (2003) 89–100

The Journal of
Steroid Biochemistry
&
Molecular Biology

www.elsevier.com/locate/jsbmb

# Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*

S. Kuntz[a], A. Chesnel[a], M. Duterque-Coquillaud[b], I. Grillier-Vuissoz[a], M. Callier[a], C. Dournon[a], S. Flament[a,*], D. Chardard[a]

[a] *Génétique, Signalisation, Différenciation, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré-Nancy I, EA3442, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France*

[b] *UMR 8526 CNRS, Mécanismes du Développement et de la Cancérisation, Institut de Biologie de Lille, 1, Rue Calmette BP 447, 59021 Lille Cedex, France*

Received 29 July 2002; accepted 19 November 2002

**Abstract**

A better understanding of vertebrate sexual differentiation could be provided by a study of models in which genetic sex determination (GSD) of gonads can be reversed by temperature. In the newt *Pleurodeles waltl*, a P450 aromatase cDNA was isolated from adult gonads, and the nucleotide or deduced amino acid sequences showed a high level of identity with various vertebrate species. In adults, aromatase expression was found in gonads and brain. In developing gonads, the expression was found to fit with the thermo-sensitive period (TSP) and was detected in both ZZ and ZW larvae, as well as in ZW submitted during the whole TSP to a masculinizing temperature. In the latter individuals, in situ hybridization and semi quantitative RT-PCR showed that, at the end of TSP, aromatase expression was at the same level than in normal ZZ larvae and was significantly lower than in normal ZW ones. Furthermore, temperature-induced down regulation did not occur when heating was performed at the end of TSP. Our results confirm the importance of aromatase regulation in female versus male differentiation and demonstrate that a down regulation of aromatase expression is involved in the process of sex reversal.
© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Aromatase; Sex differentiation; Sex reversal; Temperature; Urodele

## 1. Introduction

Sex determination of gonads in vertebrates can occur by two principal mechanisms. The first one, genetic sex determination (GSD) as exemplified in mammals and birds, is correlated with the presence of heteromorphic sex chromosomes and the sex ratio at birth is generally 1:1. The second one, temperature sex determination (TSD) is observed mainly in reptiles where incubation temperature influences gonadal sexual differentiation in the absence of heterochromosomes. Which of these two mechanisms has evolved from the other in vertebrate species is still unknown. An answer to the question of the most ancient model of vertebrate sex determination could arise from studies of species where temperature specifically induces the reversal of one sex. Indeed, while in TSD temperature can determine the phenotypic sex of a whole progeny, in other species where both types of sex determination seem to coexist, temperature allows only one sex, otherwise genetically determined, to reverse. This is the case for a growing number of fish species as *Menidia menidia* [1] and the tilapia *Oreochromis niloticus* [2]. Temperature has also been shown to counteract GSD in the urodele amphibians *Triturus cristatus* [3] and *Pleurodeles waltl* [4]. The study of the latter species would help to a better understanding of the sex determining mechanisms in vertebrates since this model allows to compare gene expression during both a genetically determined sex differentiation and a temperature-induced functional sex reversal.

*Pleurodeles* species shows a ZZ/ZW genetic mode of sex determination where the W chromosome induces a female differentiation in the ZW heterogametic sex [5], while male differentiation occurs in the ZZ homogametic one. When larvae are reared at ambient temperature, the sex ratio is 1:1, whereas raising temperature up to 32 °C during a so called thermo-sensitive period (TSP), ranging between larval stages 42 and 54, induces 100% of genetic female (ZW) larvae to differentiate into functional neomales [6].

Temperature has been thought for a long time to interfere with hormone biosynthetic pathway since estrogens have been shown to play a key role in ovarian differentiation in all classes of vertebrates, except for eutherian mammals where

* Corresponding author. Tel.: +33-83-68-42-52; fax: +33-83-90-32-77.
*E-mail address:* stephane.flament@persmail.uhp-nancy.fr (S. Flament).

0960-0760/03/$ – see front matter © 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/S0960-0760(03)00009-8

ovaries can develop in absence of estrogens. In species with GSD, like in many teleosts [7], in some amphibians [8] and in chicken [9], exogenous estrogens manifest a feminizing effect on gonads of male embryos. Estrogen induced sex reversal has also been described in species with TSD. For example, exogenous estrogens applied to eggs of the turtle *Emys orbicularis*, induce ovarian differentiation at masculinizing temperature [10]. This kind of sex reversal is also obtained in *Alligator mississipiensis* [11]. In *P. waltl*, an application of estradiol during a hormono-sensitive period induces genetic male (ZZ) larvae to differentiate into functional neofemales [12]. The anti-estrogen tamoxifene was shown to possess a masculinizing effect in *E. orbicularis* [13] and in the chicken [9].

Since estrogens play a key role in gonadal differentiation in non-mammalian vertebrates, the role of aromatase, the enzymatic complex responsible for conversion of androgens to estrogens, has been extensively investigated. In that way, it was shown that a high aromatase activity occurs during ovarian differentiation in tilapia and rainbow trout [14] as well as in chicken [15]. Likewise, in TSD reptiles such as *E. orbicularis* [16], *Crocodylus porosus* [17] and *A. mississipiensis* [18], aromatase activity is low at the beginning of TSP and increases exponentially during ovarian differentiation whereas activity remains low in differentiating testes. In *P. waltl*, gonadal aromatase activity measurements have demonstrated a significant difference between differentiating ovaries and testes: at stage 52, just before histological sex differentiation of gonads, aromatase activity markedly increases in genetic female (ZW) larvae whereas it remains weak in genetic male (ZZ) ones [19].

The role of estrogens in ovarian differentiation has been definitely established by the results of treatment with an aromatase inhibitor, which prevents conversion of androgens into estrogens and causes different degrees of masculinization according to species. This masculinizing effect was obtained with fadrozole in birds [15], in the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus uniparens* [20], in reptiles with TSD such as the turtles *E. orbicularis* [21] and *Trachemys scripta* [22], and in the urodele *P. waltl* [23].

The potential link between aromatase expression and temperature has also been studied. In the turtle *Malaclemys terrapin*, a TSD species, the rate of aromatase mRNA increases in gonads at feminizing temperature whereas it remains low at masculinizing temperature [24]. Likewise, in the fish *Paralichthys olivaceus*, aromatase expression is suppressed when XX larvae are sex reversed by increasing incubation temperature [25]. These results indicate that temperature could regulate aromatase expression, either directly or indirectly via a thermo-sensitive factor in species with TSD. In the same way, *Pleurodeles* ZW larvae reared at 32 °C show a low level of aromatase activity similar to those measured in males [19]. The present work was performed in order to better understand the role of aromatase in sex differentiation in *P. waltl* and to test the hypothesis of a regulation by temperature of aromatase expression in this species. We isolated an aromatase cDNA containing the complete open reading frame (ORF). The results of the analysis of mRNA expression in gonads during both normal development and under temperature stimulation confirmed our hypothesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal source, rearing, staging

*P. waltl* larvae were reared in fresh water at 20 ± 2 °C in our laboratory and developmental stages were determined by macroscopic observation according to Gallien and Durocher [26]. The sexual genotype of each individual was identified by electrophoretic patterning of the sex-linked peptidase-1, as described previously [19].

As a control, ZZ larvae and one part of female ZW were maintained at 20 ± 2 °C, temperature at which the sexual genotype and the sexual differentiation are concordant. Then, two groups of ZW larvae were heat treated: the first one was reared at 32 °C during the whole TSP, from stage 42 to stage 54. The last group was shifted to 32 °C for 48 h at stage 54. Before dissection, animals were anaesthetized in solution of benzocaïne diluted in water at 0.03%. Aromatase expression was studied not only in different organs of adult animals but also in gonad–mesonephros complex isolated from larvae at different stages of development. Indeed, in larvae, gonads could not be dissected alone due to their small size.

### 2.2. RNA extraction

For larvae, total RNA was extracted from the gonad–mesonephros complex by using TRIzol reagent (Invitrogen). After dissection, the complex from each animal was rapidly deposed in 200 μl of TRIzol, sonicated, vortexed and 10 μg of glycogen (Roche) were added to increase RNA recovery. After chloroform purification and isopropanol precipitation, the RNA pellet was washed with 70% ethanol, dried and resuspended in 10 μl DEPC treated water. For adult animals, total RNA was extracted from 50 to 100 mg of tissue using 1 ml of TRIzol reagent and the RNA pellet was resuspended in 25 μl DEPC treated water. The concentration of RNA was measured by spectrophotometry.

### 2.3. P450 aromatase cDNA isolation

One microgram of total RNA from adult testis was reverse transcribed using oligo($dT_{15}$) primers and Superscript II MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). An aliquot of the reaction was PCR-amplified with the degenerated primers Arom up 5′-GARAAYGTIMRICARTG-3′ and Arom dw 5′-CCIVWICCRAAIGGYTGRAA-3′. The amplification was performed in the presence of 0.1 unit of Taq DNA polymerase in PCR buffer containing 25 mM of each dNTP and 3.5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen). Touchdown PCR program was

3 min at 94 °C, 20 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, during which hybridization temperature was lowered from 60 to 40 °C. Amplification was then pursued with 30 cycles at 94 °C for 1 min, 40 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. After agarose gel electrophoresis, an expected fragment of 453 bp was excised from the gel, inserted into the plasmid pCR2 (Invitrogen) and transfected in *E. coli* INVα (Invitrogen). Positive clones were selected, plasmids were extracted with the alkaline lysis method and then sequenced (Genome Express).

The 3′-end of P450 aromatase cDNA was amplified using a rapid amplification of cDNA ends (RACE) strategy. An aliquot of cDNA from adult testis described above was PCR-amplified using an oligo($dT_{15}$) and the specific primers for aromatase Arom 1 5′-ATTGCAGCACCTGACACGAT-3′ and Arom 2 5′-GCCTGTGCAGGGAAATATAT-3′ for semi-nested PCR. A three step PCR amplification was performed according to the following schedule, 94 °C for 3 min, 30 cycles at 94 °C for 1 min, 54 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, then 72 °C for 10 min. Semi-nested PCR was performed with 20 additional cycles from 1 μl of the first PCR product. After agarose gel electrophoresis, a 390 bp fragment was eluted from gel, inserted into pCR2 vector (Invitrogen) and then sequenced (Genome Express).

The 5′-end of P450arom cDNA was then amplified using a 5′ RACE system (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech). cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA from adult ovary or testis according to manufacturer's instructions. PCR was performed with a specific primer for P450 aromatase Arom 5R 5′-CGCATGACCACGTCCACAACCCGCTG-3′ and 1 unit Taq DNA polymerase (Advantage 2 Polymerase Mix, Clontech). The reaction mixture was heated at 94 °C for 3 min, 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, 72 °C for 3 min and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplified products were separated on an agarose gel. A fragment of 1.2 kb was purified (QiaEX II Kit, QIAGEN), inserted into the plasmid pGEM-T easy (Promega) and transfected into *E. coli* TG1 strain. After extraction, the 1.2 kb fragment was restricted and subcloned into pBluescript $KS^+$, and subclones were sequenced (Genome Express). Three independent clones have been obtained for 5′ RACE P450 aromatase, two from adult testis and one from adult ovary.

### 2.4. RT-PCR

Total RNA (2 μg) from adult brain, heart, liver, kidney, testis, ovary, intestine or spleen and only 1 μg of total RNA from gonad–mesonephros complex were reverse transcribed using oligo($dT_{15}$) primers and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). Reverse transcription was performed for 2 h at 37 °C in buffer containing 25 mM of each dNTP (Invitrogen), 0.2 μg/μl oligo($dT_{15}$) and 4 units of RNasin (RNase OUT Ribonuclease, Invitrogen) in a total volume of 25 μl. A 2 μl aliquot of resultant cDNA was used for PCR. The amplification was performed with 0.1 unit of Taq DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each dNTP, 2.5 mM $MgCl_2$ and 0.4 pM of each primer in a total volume of 25 μl. Specific primers for P450 aromatase were Arom 1 5′-ATTGCAGCACCTGACACGAT-3′ and Arom 6 5′-TTGTTCTGTACATTCTCTAA-3′. The PCR product obtained from these primers was 510 bp in length. This product encompasses two exon/intron boundaries based on other vertebrate aromatase genes. As a control to ensure that the RNA was not degraded or to prevent poor transcription quality, the GAPDH primers 5′-ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3′ and 5′-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3′ were used and produced a fragment of 290 bp. The PCR conditions were 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 52 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and 72 °C for 10 min. PCR product (10 μl) was run in a 1% agarose gel and transferred to nylon membrane (Hybond-N, Amersham). Membranes were hybridized with DIG-labeled probes (DIG DNA labeling Kit, Roche) at 68 °C for 16 h in 5× SSC, 1% blocking reagent (Roche), 0.1% *N*-lauroylsarcosine, 0.02% SDS. Membranes were washed at high stringency and revealed by chemoluminescence in the presence of autoradiographic film (Hyperfilm ECL, Amersham).

### 2.5. Semi-quantitative analysis

Semi-quantitative RT-PCR was performed on gonad–mesonephros complexes at stage 52 and 54. RT-PCR reaction and southern transfer were realized as described above with 24 cycles of amplification for GAPDH and 26 cycles for aromatase. The intensity of the hybridization signal was measured by Scion Image (Scion Corporation). The relative amounts of P450arom mRNA in the gonad–mesonephros complexes were normalized to GAPDH. The variation of expression between different groups was analyzed by Student's *t*-test.

### 2.6. In situ hybridization

After dissection, gonad–mesonephros complexes were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at ambient temperature. Tissues were dehydrated through a graded series of ethanol, cleared in toluene and embedded in paraffin. The tissues were then sectioned at 7 μm and mounted on SuperFrost Plus slides (Menzel-Glaser).

Sections were dewaxed in toluene, rehydrated, treated with 0.1 M glycine, 0.2 M Tris–HCl (pH 7.4) for 10 min at room temperature and submitted to 1 μg/ml proteinase K for 15 min at 37 °C. Then, slides were postfixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at ambient temperature and treated with 0.1 M triethanol-amine (pH 8.0), 0.25% acetic anhydrid solution for 10 min at ambient temperature and then dehydrated through graded ethanol washes. Sections

were placed in hybridization mix containing 300 mM NaCl, 1 M Tris–HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 10% dextran sulphate (Pharmacia), 1× denharts, 0.5 mg/ml *E. coli* tRNA (Roche), 100 mM DTT (Sigma), 50% formamide and 40,000 cpm/μl of appropriate labeled sense or antisense denatured probe. Probes were synthesized by in vitro transcription at 39 °C for 1 h using $^{35}$S CTP. Slides were then placed in a humid chamber saturated with 50% formamide, 4× SSC and incubated at 65 °C overnight. Following hybridization, unbound probe was removed after two bathes of 4× SSC, 10 mM DTT for 30 min and 1 h at ambient temperature. Then, slides were washed in 0.15 M NaCl, 20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 50% formamide and 100 mM DTT for 30 min at 65 °C. Following washes, slides were incubated 1 h at 37 °C with 20 μg/ml RNase A. The sections were then washed, dehydrated and dried at ambient temperature. Autoradiography was then performed: slides were immersed in photographic emulsion and dried overnight in darkroom. The next day, slides were deposited in a box closed with an aluminum sheet and placed at −20 °C during 10–15 days. Slides were revealed (Unifix, Kodak) and Hoescht was used for background coloration of nucleus.

## 3. Results

### 3.1. P450 aromatase cDNA isolation

*Pleurodeles* P450 aromatase cDNA (Fig. 1) was isolated by RT-PCR from total RNA extracted from adult testis and ovary. The first clone obtained by degenerated PCR is 453 bp long as expected and is situated in the middle of the open reading frame. Then, RACE-PCR was performed and we obtained a 3′ RACE fragment of 490 bp and a 5′ RACE fragment of 1.2 kb.

The P450 aromatase cDNA contains two putative ORFs of 1497 or 1536 bp due to the presence of two initiation sites separated by 39 bp. The initiation codon used in vivo remains uncertain in this species. Aromatase cDNA includes a short 5′ untranslated region of 35 bp and a 177 bp 3′ untranslated region without polyadenylation site. Cloning of 5′ extremity was performed from adult testis and ovary cDNAs and no difference was found in 5′ UTR in these organs.

The deduced amino acid sequence of *P. waltl* P450 aromatase was compared with amino acid sequences from P450 aromatase of several species: xenopus, chicken, human, mouse and zebrafish ovarian or brain forms (Fig. 2). The *Pleurodeles* ORF encodes a putative protein of 512 amino acids which is slightly longer than that of xenopus (500 residues), chicken (507 residues), and both mouse and human (503 residues) proteins but shorter than in zebrafish ovarian type [27] and European sea bass [28] (517 residues). The best identity rate was observed with xenopus (75%). For others, identity between *P. waltl* P450 aromatase and chicken, human and mouse P450 aromatase is 68, 68 and 66% respectively. The comparison of the *Pleurodeles* aromatase with both zebrafish (Fig. 2) and goldfish (not shown) ovarian and brain aromatase forms shows a low identity rate of 50%. The conserved regions were easily identified by comparison with the corresponding regions in other species: the membrane spanning (residues 24–44), the helix I (residues 296–332), the ozols peptide (residues 355–378), the aromatic (residues 413–424) and the heme binding (residues 438–461). Identity rate of each conserved regions was also examined. The four following regions: helix I, ozols peptide, aromatase specific region and heme binding region present a high degree of identity among most species (72–100%) except for zebrafish (47–91%). For the membrane spanning region, the identity rate with other species is not more than 45%, but the hydrophobic character of this region located at the $NH_2$-terminal is conserved.

### 3.2. Tissue-specific expression in adults

Expression of P450 aromatase mRNA was examined by RT-PCR in various adult tissues: liver, heart, kidney, ovary, testis, intestine, brain and spleen (Fig. 3). P450 aromatase is expressed mainly in gonadal tissues: aromatase mRNAs were easily detected in the ovary and the testis, with an ovarian signal higher than in testis. In addition, an expression was revealed in the brain.

### 3.3. P450 aromatase expression in situ

The expression pattern of aromatase mRNA during TSP was studied by in situ hybridization. Analysis was performed in three panels of larvae: ZZ, ZW and ZW exposed to 32 °C during TSP. The localization of aromatase mRNA in the urogenital apparatus was restricted to gonads since no expression was observed in mesonephros (Fig. 4). In this organ, aromatase expression was very low at the beginning of TSP but a high level of mRNA was detected from stage 50. We observed no difference in staining intensity between the three types of larvae up to stage 52 (data not shown). At stage 54, aromatase expression was lower in ZZ larvae than in ZW animals (Fig. 4). At this stage, on sections of ZW larvae reared at 32 °C since stage 42, the signal was lower than in control ZW larvae (Fig. 4). So, at the end of TSP, the situation of heat treated ZW animals looks like that of ZZ control ones.

### 3.4. P450 aromatase is expressed early during TSP

In order to get more information about aromatase expression during TSP, we realized RT-PCR analysis in gonad–mesonephros complexes from larvae at different stages of development. This should describe what occurs in gonads since expression was restricted to this organ as shown above by in situ hybridization. By qualitative RT-PCR, we observed that expression began at stage 44 and was maintained thereafter in the three types of larvae

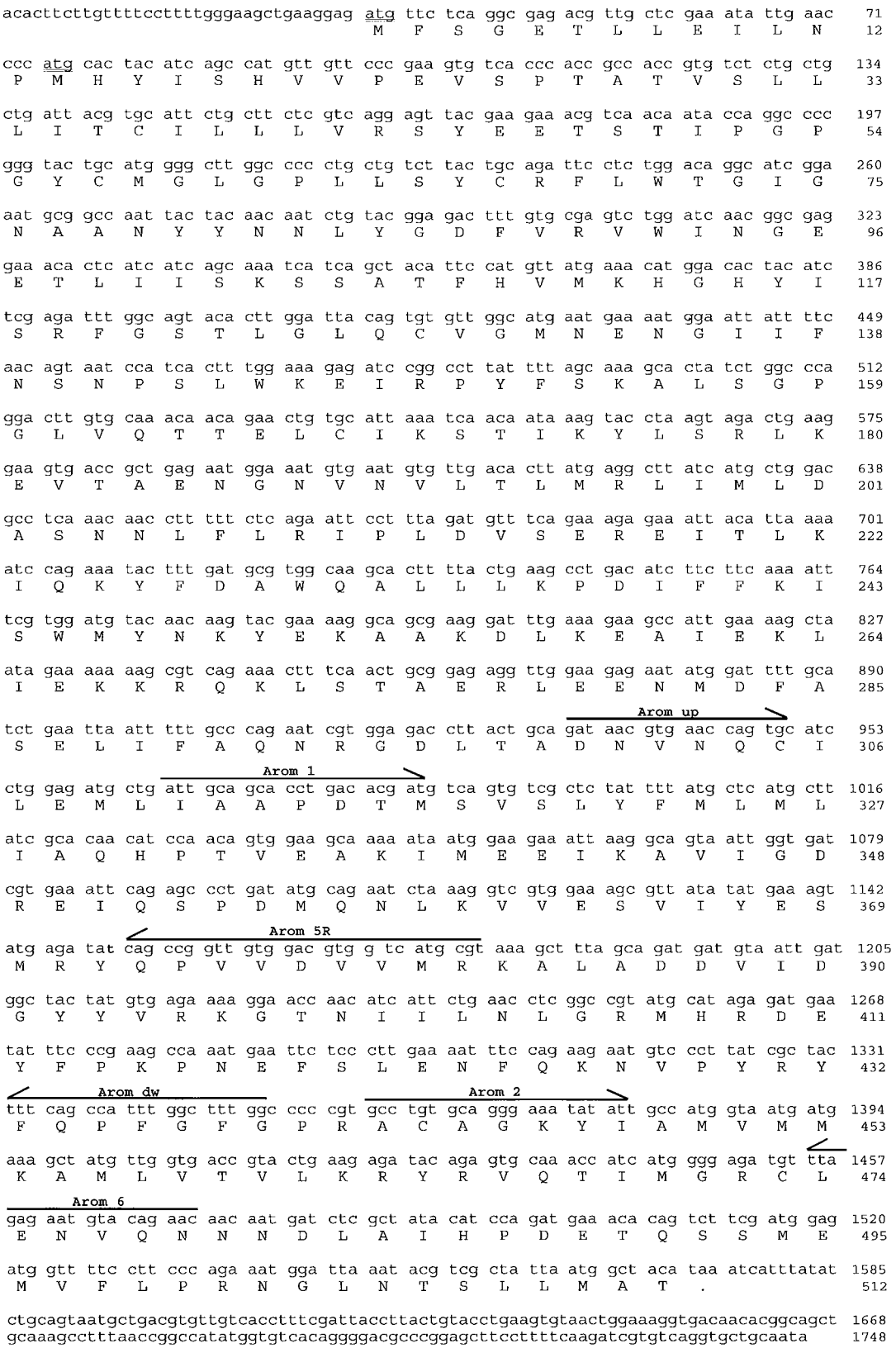



Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Pleurodeles waltl* aromatase cDNA. The P450 aromatase cDNA open reading frame was 1497 or 1536 bp depending on the initiation site. Potential initiation sites are double underlined. Aromatase cDNA includes a 35 bp 5′ untranslated region and a 177 bp 3′ untranslated region without polyadenylation site. The primers used for different PCR are arrowed. Accession number is AY135485.

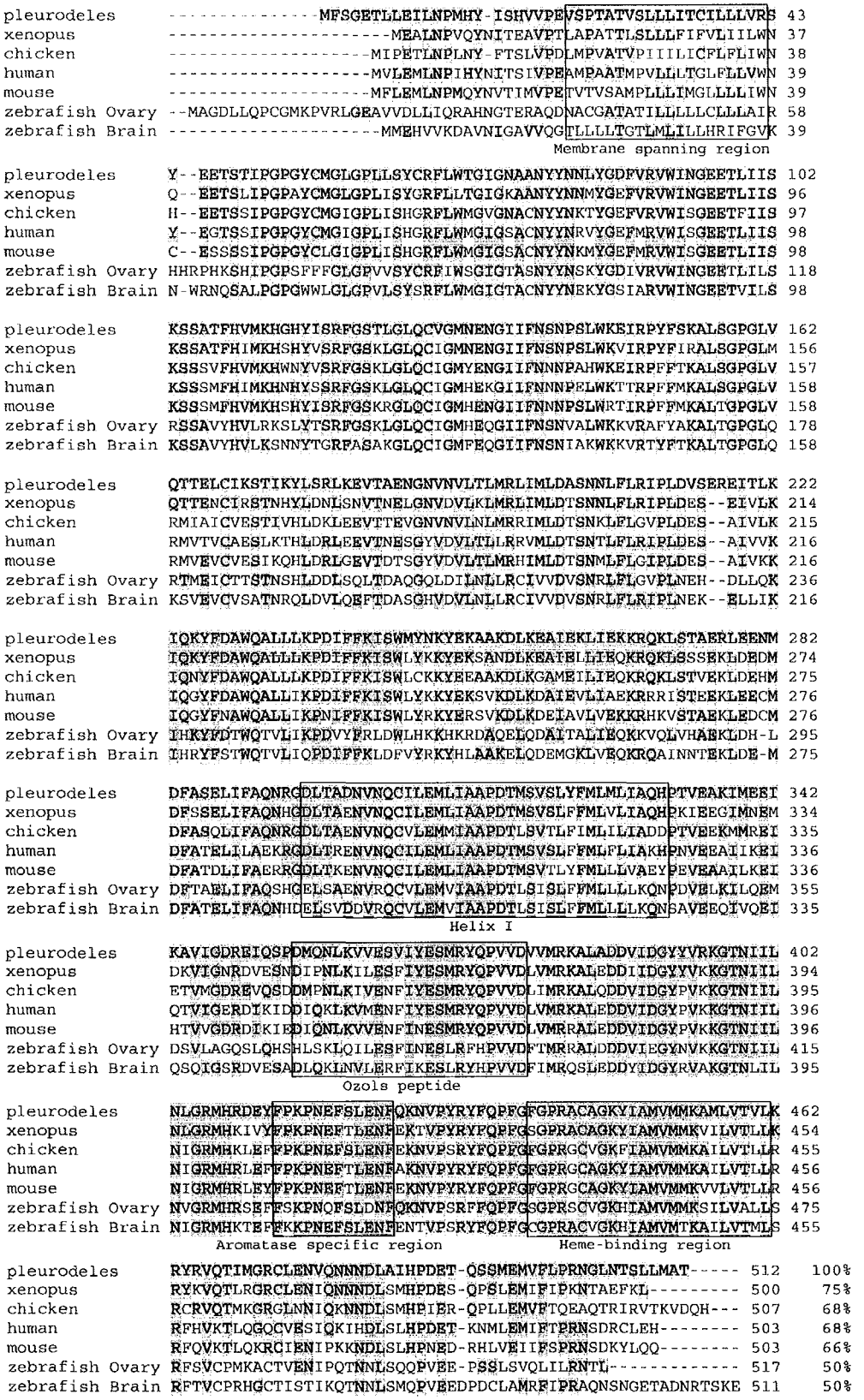



Fig. 2. Alignment of amino acid sequences of P450 aromatase from several vertebrates. Amino acid identity with *Pleurodeles* sequence is emphasized in grey. The five conserved regions: membrane-spanning, helix I, ozols peptide, aromatic and heme binding are framed.

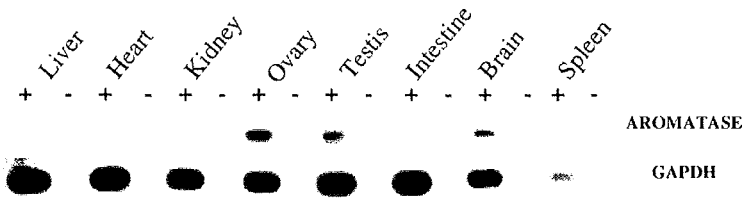



Fig. 3. Tissue-specific P450 aromatase mRNA expression in adult *Pleurodeles waltl*. Total RNA was extracted from different adult tissues: liver, heart, kidney, ovary, testis, intestine, brain and spleen, and subjected to qualitative RT-PCR. For each tissue, two experiments with (+) or without (−) reverse transcriptase were performed. GAPDH serves as a positive control.

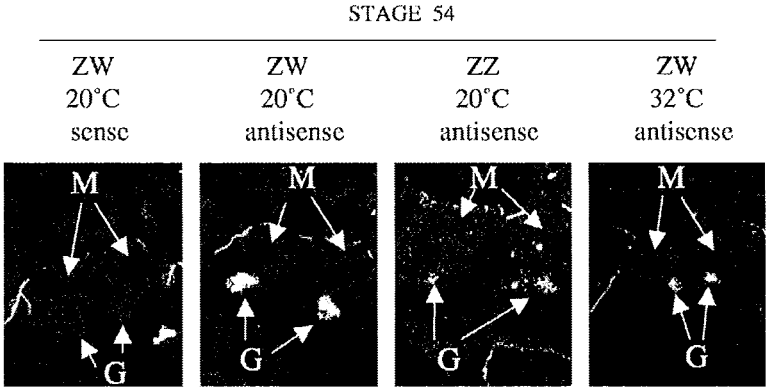



Fig. 4. Analysis of aromatase expression by in situ hybridization. Sections from larvae at stage 54 were hybridized with a sense or antisense RNA specific P450 aromatase probe at 65 °C with 50% formamide. Analysis clearly revealed that expression of aromatase is restricted to gonads (G); no expression was observed in mesonephros (M). The signal was higher in ZW larvae than in ZZ individuals or heat treated ZW larvae (Magnification 330×).

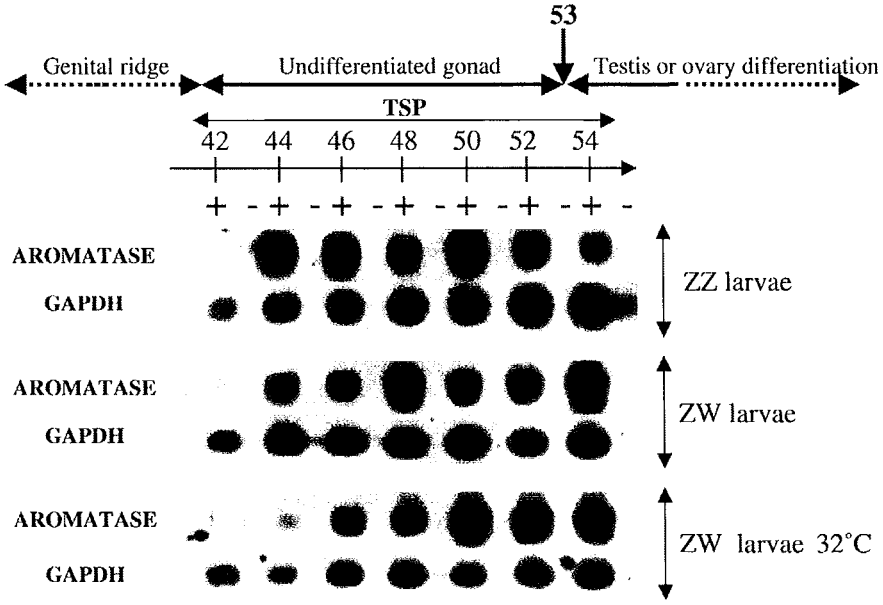



Fig. 5. Analysis by qualitative RT-PCR of P450 aromatase in gonads of ZZ larvae and ZW larvae exposed or not to 32 °C during thermo-sensitive period. At different stages of TSP: 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, total RNA was isolated from gonad–mesonephros complex, reverse transcribed and amplified by PCR for 35 cycles. GAPDH serves as a positive control. For each stage, two experiments with (+) or without (−) reverse transcriptase were performed. The beginning of aromatase expression occurs at stage 44 in the three panels of larvae.

(Fig. 5). However it should be noticed that among the high number of larvae that we analyzed, in a few cases, aromatase expression was detected at stage 42 independently of sex or treatment. This was expected to be due to individual variations.

### 3.5. P450 aromatase expression increases during ovarian differentiation

A semi-quantitative RT-PCR study was performed at the end of TSP, the period of development at which differences had been suggested to exist by in situ hybridization. At stage 52, just before histological sex differentiation of gonads, the amount of aromatase mRNA measured in ZZ larvae was not significantly different from ZW larvae (Fig. 6A). At stage 54, a significant difference was observed between female and male larvae: in all cases, the signal was higher in ZW animals than in ZZ ones (Fig. 6).

### 3.6. Masculinizing temperature is correlated with a low level of aromatase expression

Since semi-quantitative RT-PCR confirmed that there was a difference in aromatase mRNA level between ZZ and ZW individuals at stage 54 as suggested by in situ hybridization, we analyzed the effect of temperature elevation at this stage. In ZW larvae reared at 32 °C since stage 42, the P450 aromatase/GAPDH ratio was reduced down to a level which was not significantly different from those observed in control ZZ larvae (Fig. 7). The level of aromatase expression in ZW larvae heated at 32 °C at stage 54 for 48 h was also analyzed. In that case, the increase in temperature did not induce a decrease in aromatase expression (Fig. 7). This was in agreement with the fact that temperature-induced sex reversal is observed only if heat treatment is performed during the whole TSP [6].

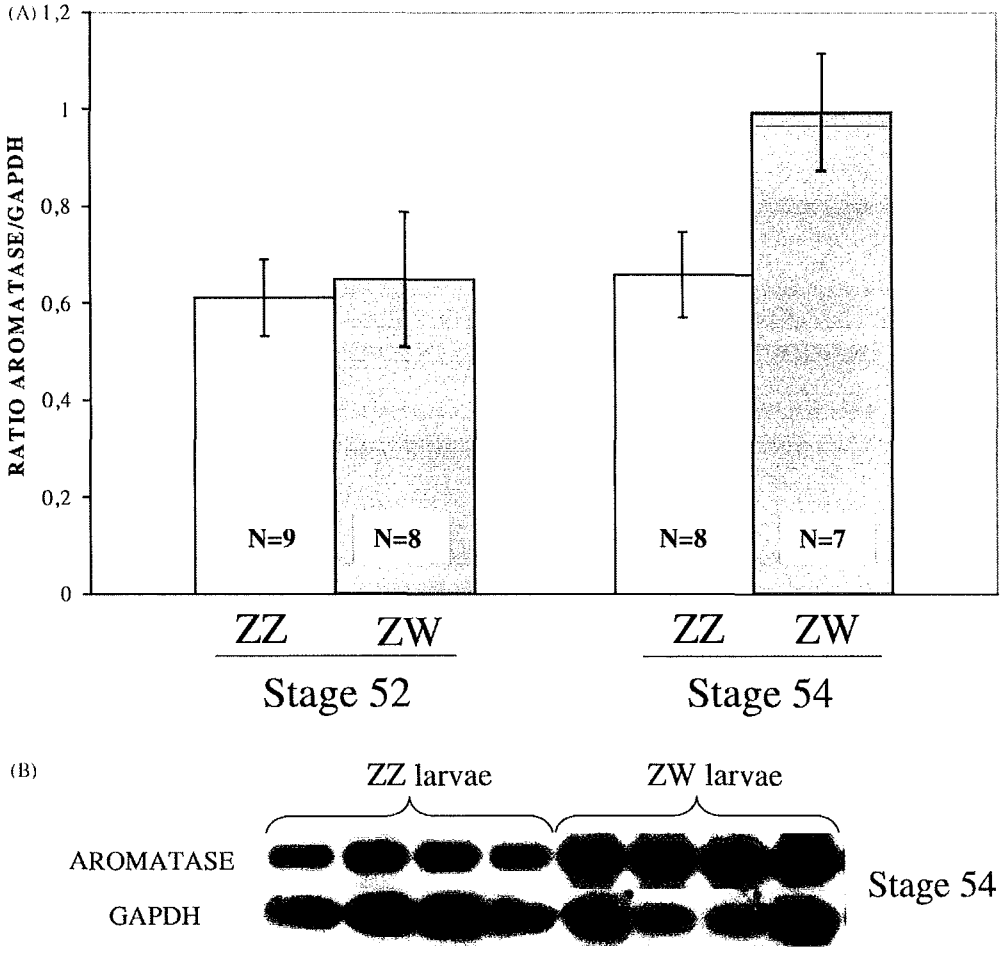



Fig. 6. Aromatase expression in ZZ and ZW larvae during sexual differentiation. (A) Total RNA of gonad–mesonephros complex of ZZ and ZW individuals was reversed transcribed and amplified by PCR for 26 cycles. After hybridization, relative amounts of P450 aromatase mRNA were normalized to GAPDH. Values are means of replicates, the number of which is indicated by *N*. Vertical bars indicate the mean standard error. We did not measure difference between ZZ and ZW larvae at stage 52 ($P = 0.80$), but at stage 54, aromatase expression increases in ZW larvae and is 1.5-fold higher than in ZZ larvae ($P = 0.04$). (B) At stage 54, total RNA of four ZZ and ZW individuals isolated from a pair of gonads not dissociated from mesonephros was reverse transcribed, amplified by PCR for 26 cycles, hybridized and revealed by chemoluminescence.

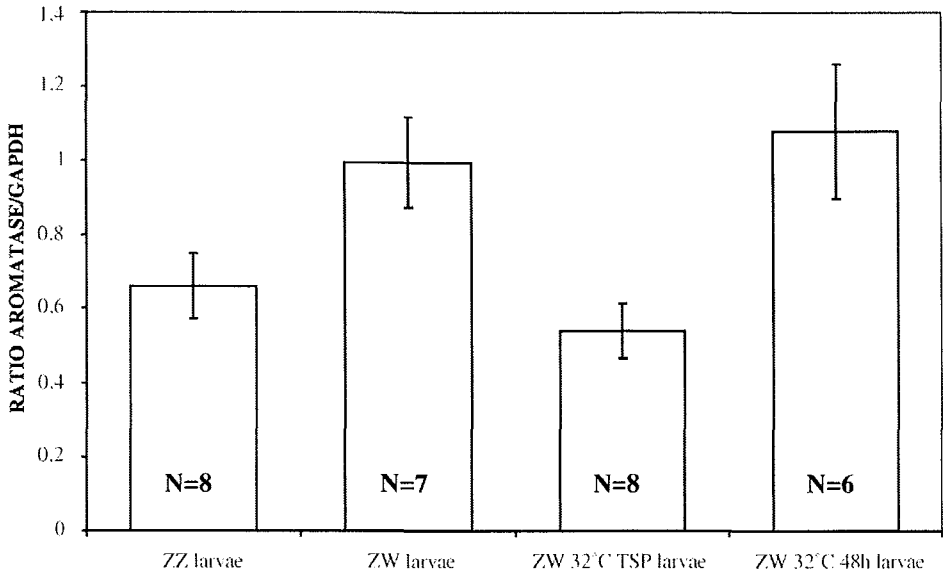



Fig. 7. Effect of temperature on aromatase expression after heating ZW larvae at 32 °C during all TSP or during 48 h. Relative amounts of P450-aromatase mRNA were normalized to GAPDH. Values are means of replicates, the number of which is indicated by *N*. Vertical bars indicate the mean standard error. Aromatase expression level in ZW larvae heated at 32 °C during all TSP was not significantly different from those observed in ZZ larvae ($P = 0.32$) but was significant from those observed in ZW larvae ($P = 0.006$). At this stage, temperature had no effect when ZW larvae were heated during 48 h: the level of aromatase expression was similar to those of control ZW larvae ($P = 0.69$).

## 4. Discussion

Previous studies on *P. waltl* applying treatments with estrogens and aromatase inhibitors, as well as measurements of aromatase activity during normal development and sex reversal showed that estrogens are involved in ovarian differentiation [12,19,23]. The present work was performed in order to better study this phenomenon and to test the hypothesis of a link between temperature-induced sex reversal and aromatase expression.

We have isolated from adult gonads a P450 aromatase cDNA which contains the complete ORF. The 5′ untranslated region obtained from three independent experiments of RACE-PCR was not longer than 35 bp. This result is consistent with those observed for many P450 aromatase cDNA isolated from species such as European sea bass [28], tilapia [29] as well as xenopus [30] or human [31]. Moreover, like in fishes such as rainbow trout [32], tilapia [29], Japanese flounder [25], zebrafish [33] or European sea bass [28], *Pleurodeles* aromatase cDNA has two potential initiation codons which are separated by 39 bp. However, the ATG used in vivo is not clearly defined in all these species. Hence, the deduced amino acid sequence size of *P. waltl* is either 499 or 512 amino acids depending on the initiation codon. Comparisons of the *Pleurodeles* sequence with that from other species showed 75% of identity with xenopus against 68% with chicken or human and only 66% with mouse. Comparison with zebrafish or goldfish gave the lowest identity (50%).

RT-PCR analysis of aromatase expression in various adult tissues of *Pleurodeles* revealed that P450 aromatase mRNAs were present in both male and female gonadal tissues. A signal was also revealed in the brain. The amplification level in the ovary was higher than in the testis or in the brain. In other tissues studied, we did not detect any aromatase expression. These results are identical to those found in European sea bass [28] and channel catfish [34]. However, in other species, aromatase transcripts have also been described in other organs. For instance, in the Japanese flounder, P450 aromatase expression was reported in the spleen [25]. In *Xenopus*, aromatase transcripts were detected in kidney, heart and liver [30]. Taken together, these results indicate that in adult tissues of non-mammalian vertebrates, aromatase is mainly expressed in ovary, testis and brain whereas its expression is rather weak in other tissues depending on species. In *Pleurodeles*, the presence of aromatase transcripts in testis could be related to a role of estrogens in spermatogenesis as demonstrated in mammals [35].

The presence of aromatase transcripts in the brain has been reported during development of reptiles such as *M. terrapin* [24] and *A. mississipiensis* [36]. This phenomenon has been also described in birds as zebra finch where the enzyme probably plays a part in the differentiation of sexual behavior [37]. While in mammals CYP 19 transcripts are known to arise from an alternative tissue-specific splicing [38], two *CYP19* genes encoding different P450 aromatases were isolated recently in the ovary and in the brain of several fish species such as goldfish [39], zebrafish [27] and tilapia [40]. In the latter species, the two isoforms were present at the same time in the ovary and in the brain but in different amount. So, the question arises whether a similar situation exists in *P. waltl*. In the present study, no difference was

seen between sequences obtained from adult ovary or testis. However, it remains to verify if an aromatase isoform could be present in *Pleurodeles* brain. Our RT-PCR experiment on adult tissues does not allow the discrimination between two hypothetical forms (brain versus ovarian) of aromatase mRNA. Moreover, the comparison with fishes aromatase sequences did not give us further information since the *Pleurodeles* aromatase is not closer to the ovarian form than to the brain form of both zebrafish and goldfish species. Experiments are underway to clarify whether a different aromatase mRNA exists in *Pleurodeles* brain.

During development of *Pleurodeles* larvae, gonadal aromatase mRNAs were easily detectable by in situ hybridization only from stage 50. On the histological sections, we observed that in the urogenital apparatus, the signal was restricted to gonadal tissue. This allowed us to study aromatase expression by a qualitative RT-PCR method which showed that aromatase mRNA was transcribed very early during sexual differentiation in ZZ, ZW and ZW larvae heated at 32 °C during all TSP. Aromatase transcripts were actually detected as soon as stage 44. In a few cases, expression was observed at stage 42 and was probably the result of individual variation. A signal was observed at all the other stages of TSP. The differences in the results obtained by in situ hybridization and RT-PCR are probably due to a difference in the sensitivity of the two methods. A similar early expression of aromatase before sex differentiation has also been described in zebrafish [41], as well as in *A. mississipiensis* [36]. On the contrary, a correlation between the beginning of aromatase expression and occurrence of the first signs of sex differentiation has been reported in *Xenopus* [30] and in the chicken [42,43]. What could be the reason for such an early expression during gonadal development of some species including *Pleurodeles*? Since we did not detect any difference between ZZ and ZW larvae before stage 54, one might propose that there is not a relevant function at these early stages. Besides, aromatase activity measurements did not reveal a significant activity of the enzyme at the early stages of TSP [19].

When observed by in situ hybridization, the degree of aromatase mRNA expression at stage 54 appeared to be lower in ZZ individuals than in ZW larvae. This observation was confirmed by semi-quantitative RT-PCR. This result was in agreement with data about aromatase expression in other non-mammalian vertebrates and confirmed that an increase in the level of aromatase expression actually seems to be the main pathway for female gonadal differentiation [14,24,25,36,40,44].

However, the results deduced from our semi-quantitative RT-PCR analysis were only partially in accordance with those of aromatase activity measurement previously obtained in our laboratory [19]. Of course, aromatase activity was shown to be higher in ZW larvae than in their ZZ counterparts at stage 54. Nevertheless, in females, the value was 40-fold higher than those measured in males whereas in the present study, the ratio aromatase/GAPDH was only 1.5-fold higher [19]. Besides, a small difference in aromatase activity was already observed between male and female larvae at stage 52 whereas no difference could be observed at the mRNA level. This could suggest that aromatase activity is also regulated at the post-transcriptional level. Recently, changes in cerebral aromatase activity were reported following treatments with kinase activators [45]. It might be interesting to study the involvement of such a regulation in sex differentiation and sex reversal.

The last part of this work was devoted to the analysis of the effects of temperature on aromatase expression in the context of temperature-induced sex reversal. Indeed, it was demonstrated that estradiol abolishes masculinizing effect of high temperature [46], indicating that estrogens are important in ovarian differentiation and that temperature acts upstream in repressing directly or indirectly estrogen synthesis. Moreover, exposure of ZW larvae to 32 °C during all TSP results in a decrease of aromatase activity [19]. So, we hypothetized that this could be the result of a decrease in aromatase expression as suggested in several species of fishes and reptiles [10,24,25,36,47].

In *P. waltl*, study of aromatase expression in ZW larvae heat-treated during all TSP showed that at stage 54, aromatase mRNAs were present in similar amount than in ZZ larvae. Again, this result was suggested by in situ hybridization and then confirmed by semi-quantitative RT-PCR. So, as expected from other species, temperature seems to repress aromatase expression in *P. waltl*. However, when heat treatment was performed at the end of TSP (32 °C for 48 h at stage 54), the level of aromatase mRNA was not modified. This observation was in agreement with the fact that such a treatment does not affect aromatase activity [19], and sex reversal of ZW larvae is obtained only if heat treatment is applied during the whole TSP [6]. These results together suggest that the action of temperature on the overexpression of aromatase mRNA or on the inhibition of its degradation would necessarily imply elements that are present during the whole TSP but absent after stage 54.

We have brought an additional support to the conservation of the aromatase sequence in vertebrates as well as the conservation of its expression in both gonads and brain. Further, our results on the *Pleurodeles* species are in agreement with the well known role of estrogen hormones in the female differentiation of lower vertebrates. Particularly, we report here that ZW *Pleurodeles* larvae, that have been sex reversed in a temperature-dependent manner, show the same level of aromatase expression as a ZZ larvae. Alternatively, aromatase is over-expressed in gonads of normal ZW individuals but not ZZ ones, suggesting a regulation at the transcriptional level. Whether the raise of mRNA expression in ZW larvae can account for the sex-dependent differential level in aromatase activity is not yet established, and we cannot rule out the possibility of a regulation at the post-transcriptional level. Whatever this regulation may be, its sensitivity to temperature appears to be restricted to a defined period of development, the TSP, which constitutes an interesting basis

for a differential screening of genes potentially implicated in this pathway.

Additionally, a possible involvement of a brain aromatase expression in sex reversal must be taken into consideration for a better understanding of the *Pleurodeles* sex determination model.

## Acknowledgements

We thank Christiane Tankosic, Alain Iurétig and Anne-Claire Flourens for their technical assistance. 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 des Vosges" and of the "Association pour la Recherche sur le Cancer". Sandra Kuntz was recipient of a grant from the French "Ministère de la Recherche".

## References

[1] D.O. Conover, B.E. Kynard, Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish, Science 213 (1981) 577–579.

[2] J.F. Baroillier, D. Chourrout, A. Fostier, B. Jalabert, Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*, J. Exp. Zool. 273 (1995) 216–223.

[3] H. Wallace, B.M.N. Wallace, Sex reversal of the newt *Triturus cristatus* reared at extreme temperature, Int. J. Dev. Biol. 44 (2000) 807–810.

[4] C. Dournon, C. Houillon, 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 (1984) 361–378.

[5] J.C. Lacroix, R. Azzouz, F. Simon, M. Bellini, J. Charlemagne, C. Dournon, Lampbrush W and Z chromosome characterization with a monoclonal antibody and heat-induced chromosomal markers in the newt *Pleurodeles waltl*: W chromosome plays a role in female sex determination, Chromosoma 99 (1990) 307–314.

[6] C. Dournon, C. Houillon, Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage, Reprod. Nutr. Dev. 25 (1985) 671–688.

[7] T. Yamamoto, Hormonic factors affecting gonadal sex differentiation in fish, Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. 1 (1962) 341–345.

[8] H. Wallace, G.M.I. Badawy, B.M.N. Wallace, Amphibian sex determination and sex reversal, Cell. Mol. Life Sci. 55 (1999) 901–909.

[9] D. Scheib, Effects and roles of estrogens in avian gonadal differentiation, Differentiation 23 (Suppl.) (1983) 587–592.

[10] C. Pieau, Temperature variation and sex determination in reptiles, Bioessays 18 (1996) 19–26.

[11] V.A. Lance, M.H. Bogart, Disruption of ovarian development in alligator embryos, Gen. Comp. Endocrinol. 86 (1992) 59–71.

[12] L. Gallien, Sur la descendance unisexuée d'une femelle de *Pleurodeles waltlii* Michah. ayant subi pendant sa phase larvaire l'action gynogène du benzoate d'oestradiol, C.R. Séances Acad. Sci. (Paris) (D) 233 (1951) 828–830.

[13] M. Dorizzi, T.M. Mignot, A. Guichard, G. Desvages, C. Pieau, Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles, Differentiation 47 (1991) 9–17.

[14] Y. Guiguen, J.F. Baroiller, M.J. Ricordel, K. Iseki, O.M. McMeel, S.A.M. Martin, A. Fostier, 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 (1999) 154–162.

[15] A. Elbrecht, R.G. Smith, Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens, Science 255 (1992) 467–470.

[16] G. Desvages, C. Pieau, Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 41 (1992) 851–853.

[17] C.A. Smith, J.M.P. Joss, Steroidogenic activity and ovarian differentiation in the saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*, Gen. Comp. Endocrinol. 93 (1994) 232–245.

[18] C.A. Smith, P.K. Elf, J.W. Lang, J.M.P. Joss, Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos, Differentiation 58 (1995) 281–290.

[19] D. Chardard, G. Desvages, C. Pieau, C. Dournon, 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 (1995) 100–107.

[20] K.L. Wennstrom, D. Crews, Making males from females: the effects of aromatase inhibitors on a parthenogenetic species of whiptail lizard, Gen. Comp. Endocrinol. 99 (1995) 316–322.

[21] M. Dorizzi, N. Richard-Mercier, G. Desvages, M. Girondot, C. Pieau, Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature dependent sex determination, Differentiation 58 (1994) 1–9.

[22] T. Wibbels, D. Crews, Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature dependent sex determination, J. Endocrinol. 141 (1994) 295–299.

[23] D. Chardard, C. Dournon, Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*, J. Exp. Zool. 283 (1999) 43–50.

[24] P. Jeyasuria, A.R. Place, Temperature-dependent aromatase expression in developing diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) embryos, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 61 (1997) 415–425.

[25] T. Kitano, K. Takamune, T. Kobayashi, Y. Nagahama, S.I. Abe, Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), J. Mol. Endocrinol. 23 (1999) 167–176.

[26] L. Gallien, M. Durocher, Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl*, Bull. Biol. Fr. Belg. 91 (1957) 97–114.

[27] E.F.L. Chiang, Y.L. Yan, S.K. Tong, P.H. Hsiao, Y. Guiguen, J. Postlethwait, B.C. Chung, Characterization of duplicated zebrafish *cyp19* genes, J. Exp. Zool. 290 (2001) 709–714.

[28] L. Dalla Valle, L. Lunardi, L. Colombo, P. Belvedere, European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 80 (2002) 25–34.

[29] X.T. Chang, T. Kobayashi, H. Kajiura, M. Nakamura, Y. Nagahama, Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis, J. Mol. Endocrinol. 18 (1997) 57–66.

[30] K. Miyashita, N. Shimizu, S. Osanai, S. Miyata, Sequence analysis and expression of the P450 aromatase and estrogen receptor genes in the xenopus ovary, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 75 (2000) 101–107.

[31] C.Jo. Corbin, S. Graham-Lorence, M. McPhaul, J.I. Mason, C.R. Mendelson, E.R. Simpson, Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 85 (1988) 8948–8952.

[32] M. Tanaka, T.M. Telecky, S. Fukada, S. Adachi, S. Chen, Y. Nagahama, Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding p-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17β in the ovary, J. Mol. Endocrinol. 8 (1992) 53–61.

[33] M. Kishida, G.V. Callard, Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development, Endocrinology 142 (2) (2001) 740–750.

[34] J.M. Trant, J. Lehrter, T. Gregory, S. Nunez, J. Wunder, Expression of cytochrome P450 aromatase in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 61 (3–6) (1997) 393–397.

[35] K.M. Robertson, L. O'Donnell, M.E. Jones, S.J. Meachem, W.C. Boon, C.R. Fisher, K.H. Graves, R.I. McLachlan, E.R. Simpson, Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp19*) gene, Proc. Natl. Acad. Sci. 96 (14) (1999) 7986–7991.

[36] W.N. Gabriel, B. Blumberg, S. Sutton, A.R. Place, V.A. Lance, Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures, J. Exp. Zool. 290 (2001) 439–448.

[37] P. Shen, C.W. Campagnoni, K. Kampf, B.A. Schlinger, A.P. Arnold, A.T. Campagnoni, Isolation and characterization of zebra finch aromatase cDNA: in situ hybridization reveals high aromatase expression in the brain, Mol. Brain Res. 24 (1994) 227–237.

[38] L.M. Bershtein, Molecular-genetic aspects of estrogen production: *aromatase* gene, Mol. Biol. 31 (1997) 655–659.

[39] G.V. Callard, A. Tchoudakova, Evolutionary and functional significance of two *cyp19* genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 61 (3–6) (1997) 387–392.

[40] J.Y. Kwon, B.J. McAndrew, D.J. Penman, Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female nile tilapia *Oreochromis niloticus*, Mol. Reprod. Dev. 59 (2001) 359–370.

[41] J.M. Trant, S. Gavasso, J. Ackers, B.C. Chung, A.R. Place, Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*CYP19a* and *CYP19b*) in zebrafish fry (*Danio rerio*), J. Exp. Zool. 290 (2001) 475–483.

[42] K. Yoshida, K. Shimada, N. Saito, Expression of $P450_{17\alpha}$ hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation, Gen. Comp. Endocrinol. 102 (1996) 233–240.

[43] J.E. Andrews, C.A. Smith, H.S. Andrews, Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo, Gen. Comp. Endocrinol. 108 (1997) 182–190.

[44] C.A. Smith, J.E. Andrews, H.S. Andrews, Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 60 (1997) 295–302.

[45] J. Balthazart, M. Baillien, G.F. Ball, Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 79 (2001) 261–277.

[46] P. Zaborski, Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and HY antigen expression in gonads of a newt, Prog. Clin. Biol. Res. 217A (1986) 163–169.

[47] H. D'Cotta, A. Fostier, Y. Guiguen, M. Govoroun, J.F. Baroiller, Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*, Mol. Reprod. Dev. 59 (2001) 265–276.

## 2) Synthèse sur le rôle des stéroïdes et de l'aromatase au cours de la différenciation sexuelle chez *Pleurodeles waltl*

(«Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*» Kuntz *et al.*, 2003)

Chez *Pleurodeles waltl*, les hormones stéroïdes jouent un rôle important dans le contrôle de la différenciation gonadique et peuvent induire des inversions sexuelles fonctionnelles (Fig.23). Effectivement, le benzoate d'œstradiol féminise des larves génétiquement mâles ZZ (Gallien L., 1951). La testostérone n'a pas d'effet masculinisant chez des larves génétiquement femelles ZW alors qu'elle induit une féminisation des larves ZZ (Gallien L., 1954b). Ce dernier effet, dit paradoxal, a été décrit chez d'autres amphibiens et certains reptiles TSD (Wibbels T. et Crews D., 1992; Wallace H. *et al.*, 1999). Il a été expliqué par l'aromatisation de la testostérone en œstradiol et l'hypothèse a été confirmée par l'application d'androgènes non aromatisables (Crews D. *et al.*, 1996; Pieau C., 1974). Chez le pleurodèle, la dihydrotestostérone (DHT), androgène qui provient de la conversion de la testostérone par la 5α reductase, n'affecte pas la différenciation sexuelle de larves ZZ alors qu'elle masculinise des larves génétiquement femelles ZW (Chardard D. *et al.*, 2003). Jusqu'à présent, l'effet masculinisant d'androgènes n'avait jamais été démontré chez notre modèle. Par contre, chez les poissons, les androgènes 11-oxygénés semblent être impliqués dans la différenciation testiculaire (Van den Hurk R. et Van Oordt P.G., 1985; Baroiller J.F. et Toguyeni A., 1995). L'exposition de larves ZW de pleurodèle à la 11β hydroxyandrostenedione a conduit à un effet masculinisant plus important que la DHT (Chardard D. *et al.*, 2003). Cependant l'implication des androgènes dans la différenciation mâle reste à confirmer, alors que le rôle crucial des œstrogènes et notamment celui de l'aromatase, l'enzyme responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes est incontestable chez notre modèle. Effectivement, l'activité aromatase augmente chez les larves femelles ZW à partir du stade 52, avant l'approche de la différenciation sexuelle tandis qu'elle reste faible chez les larves ZZ (Chardard D. *et al.*, 1995). La corrélation entre un haut niveau d'activité aromatase et la différenciation ovarienne a été démontrée par différents traitements : l'activité augmente lors de la féminisation de larves ZZ par l'œstradiol tandis qu'elle diminue lors de la masculinisation de larves ZW par l'application d'un inhibiteur d'aromatase, le fadrozole (Chardard D. et Dournon C., 1999). Ainsi, une synthèse importante d'œstrogènes semble être essentielle afin d'atteindre un niveau seuil, nécessaire pour diriger la différenciation ovarienne. Lors de l'effet paradoxal chez les larves ZZ, la conversion de la testostérone en œstradiol atteint

un niveau suffisant pour induire une différenciation femelle. De même, lors du traitement avec le fadrozole, les larves ZW qui échappent à la masculinisation présentent un haut niveau d'œstrogènes corrélé à une activité aromatase importante (Fig.23).

Cette production de stéroïdes semble être régulée par la température puisque l'effet masculinisant d'une température élevée peut être contrecarré par les œstrogènes (Zaborski P., 1986). En outre, l'activité aromatase et le niveau de transcrits chez des larves ZW élevées à 32°C pendant toute la période thermosensible est similaire à celui observé chez les individus mâles ZZ (Chardard D. *et al.*, 1995) ( voir partie résultats I.1). Cependant, cet effet inhibiteur de la température sur l'aromatase n'est observé qu'à la fin de la période thermosensible suggérant plutôt une action indirecte *via* un autre facteur thermosensible ou *via* un autre tissu comme le cerveau où des transcrits aromatase ont été détectés (voir partie résultats I.1).

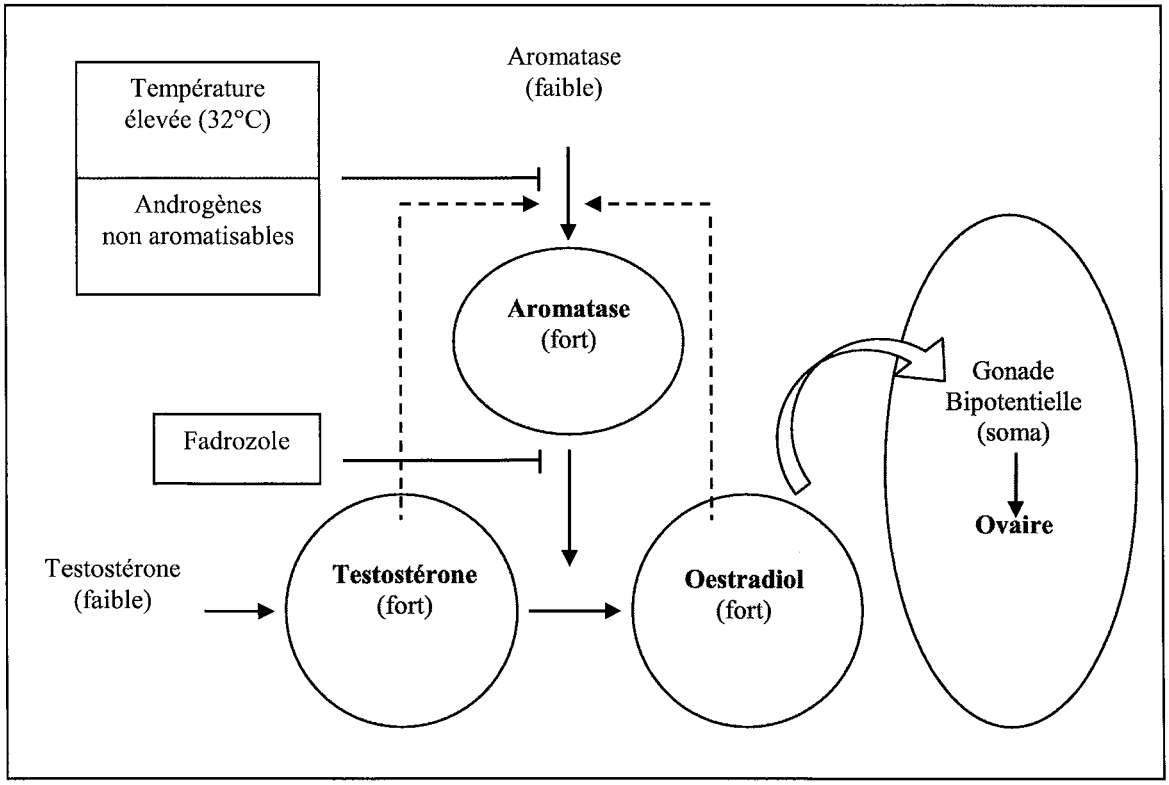



**Figure 23 : Rôle des hormones stéroïdes au cours de la différenciation ovarienne chez *Pleurodeles waltl*.** Les cercles gris représentent les évènements importants qui ont lieu lors de la différenciation femelle. L'application de testostérone conduit à un développement femelle des larves génétiquement mâles ZZ. L'application du fadrozole (un inhibiteur d'aromatase), d'androgène non aromatisable ou d'une température de 32°C pendant toute la TSP entraîne une inversion sexuelle des larves ZW.

## * Article 2 (revue).

Présentation orale au «Third International Symposium on the biology of vertebrate sex determination» le 25 mars 2003 à Hawaii (USA).

Cytogenet Genome Res 101:283–288 (2003)
DOI: 10.1159/000074350

Cytogenetic and Genome Research

# Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*

S. Kuntz, D. Chardard, A. Chesnel, I. Grillier-Vuissoz and S. Flament

EA 3442 Génétique, Signalisation, Différenciation, Université Henri Poincaré, Nancy (France)

**Abstract.** In the newt *Pleurodeles waltl*, genetic sex determination obeys female heterogamety (female ZW, male ZZ). In this species as in most of non-mammalian vertebrates, steroid hormones play a key role in sexual differentiation of gonads. In that context, male to female sex reversal can be obtained by treatment of ZZ larvae with estradiol. Male to female sex reversal has also been observed following treatment of ZZ larvae with testosterone, a phenomenon that was called the "paradoxical effect". Female to male sex reversal occurs when ZW larvae are reared at 32 °C during a thermosensitive period (TSP) that takes place from stage 42 to stage 54 of development. Since steroids play an important part in sex differentiation, we focussed our studies on the estrogen-producing enzyme aromatase during normal sex differentiation as well as in experimentally induced sex reversal situations. Our results based on treatment with non-aromatizable androgens, aromatase activity measurements and aromatase expression studies demonstrate that aromatase (i) is differentially active in ZZ and ZW larvae, (ii) is involved in the paradoxical effect and (iii) might be a target of temperature. Thus, the gene encoding aromatase might be one of the master genes in the process leading to the differentiation of the gonad in *Pleurodeles waltl*.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

Sex determination is the switch process by which an embryo will develop into a male or a female. In vertebrates, despite a relatively well conserved pattern of gonad differentiation, species have evolved multiple ways of initiating testicular or ovarian development. Roughly, two mechanisms can be distinguished: genetic sex determination (GSD) where sex is determined by sex chromosome constitution, and environmental sex determination (ESD) where sex is determined by environmental factors such as temperature as exemplified in many reptiles. Thus, the use of multiple models is of considerable interest to unravel sex determination mechanisms.

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 des Vosges and of the Association pour la Recherche sur le Cancer. S.K. is recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche.

Received 30 May 2003; revision accepted 23 June 2003.

Request reprints from Prof. Stéphane Flament
Université Henri Poincaré-Nancy I, Faculté des Sciences
EA3442, Entrée 1B – 9ème étage, Boulevard des Aiguillettes
BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, (France)
telephone: 03-83-68-42-52; fax: 03-83-90-32-77
e-mail: stephane.flament@persmail.uhp-nancy.fr

In this regard, the newt *Pleurodeles waltl* is an interesting model since this urodele amphibian species displays GSD, and functional sex reversal can be obtained by thermal treatment. This species obeys female heterogamety: females possess ZW chromosomes whereas males have ZZ chromosomes. Although sex chromosomes are homomorphic and cannot be distinguished by conventional karyotyping, the genotype can be deduced from the analysis of a sex-linked marker: peptidase 1. This dimeric and polymorphic enzyme is encoded by two codominant genes: pep1A on chromosome Z and pep1B on chromosome W (Ferrier et al., 1980). So, in ZW larvae the analysis of the electrophoretic pattern of peptidase 1 leads to a three-banded pattern (either AA, AB or BB isoforms) whereas only one spot is detected in ZZ individuals (AA isoform), provided that there is no allelic polymorphism.

## Gonadal differentiation

Following the activation of sex determination mechanisms, sex differentiation takes place (Hayes, 1998; Wallace et al., 1999). However, much is unknown about the mechanisms involved in gonadal differentiation in *Pleurodeles* as well as in



© 2003 S. Karger AG, Basel
0301–0171/03/1014–0283$19.50/0

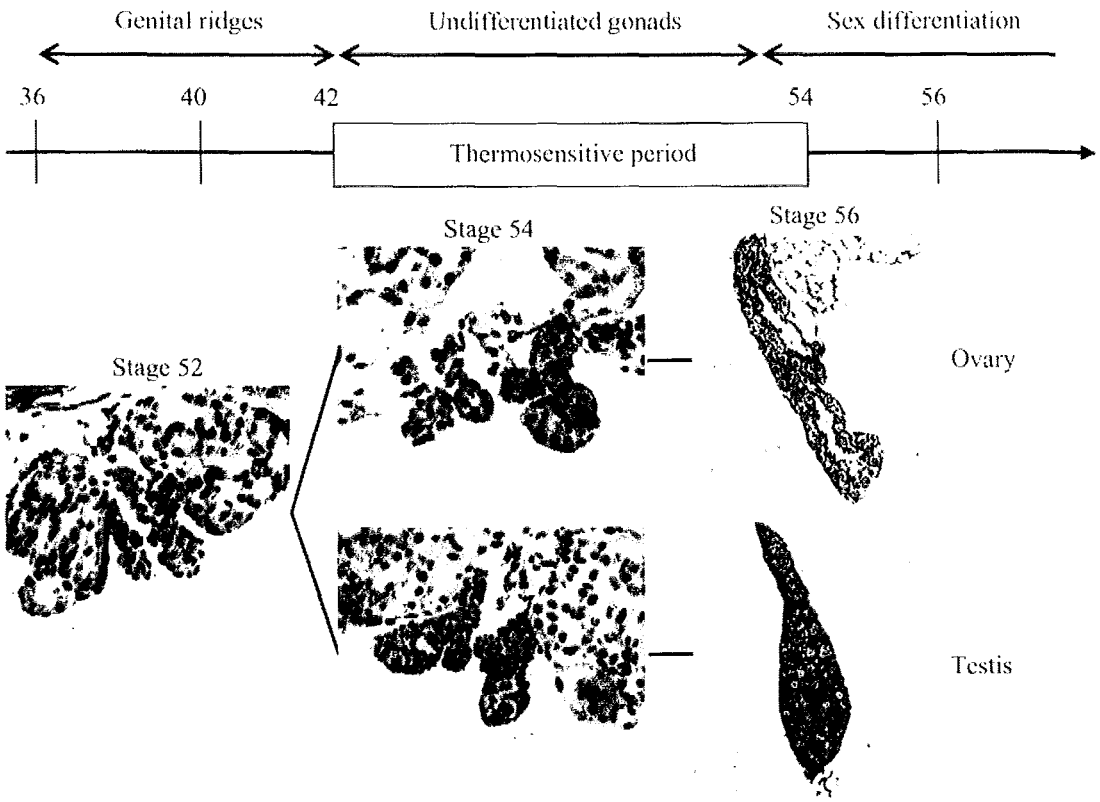



**Fig. 1.** Gonadal differentiation in *Pleurodeles waltl*. Several stages, determined according to the table of development of Gallien and Durocher (1957), are shown along the axis. Gonadogenesis begins by the formation of the genital ridge which ends at stage 42. Then the indifferent state follows up to stage 53 at which the differentiation in ovary or testis can be ascertained by histological examination (see text for details). The development of *Pleurodeles* larvae includes a thermosensitive period from stage 42 to 54, during which sex reversal can be induced by rearing ZW larvae at 32 °C.

other amphibians. The gonads originate from an out-pocket of cells on the ventral surface of the mesonephros. Migrating germ cells colonize the mesoderm leading to the formation of a genital ridge. The gonads develop due to 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 occurs by 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 (Fig. 1). 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 metamorphosis (Dournon et al., 1990; Hayes, 1998).

### Sex reversal

In *Pleurodeles waltl*, several kinds of sex reversal can be obtained experimentally. In this species, as in fishes (Guiguen et al., 1999), reptiles (Pieau et al., 2001) or birds (Scheib, 1983), i.e. in non-mammalian vertebrates, steroid hormones are involved in sex differentiation and they can induce a definitive sex reversal. When treated by estradiol benzoate, ZZ individuals differentiate into functional neo-females (Gallien, 1951; Chardard et al., 2003). So, estradiol induces a feminizing way that could be autonomously maintained. No effect on gonadal differentiation is observed when this steroid is applied on ZW larvae. Testosterone induces more surprising results: this compound cannot masculinize ZW larvae but it induces the feminization of ZZ individuals (Gallien, 1954). This is the famous paradoxical effect that is also observed in other species of urodele amphibians (Gallien, 1962; Hayes, 1998) and reptiles (Wibbels and Crews, 1992).

Other cases of sex reversal can be obtained by increasing the temperature of the rearing water. Indeed, at room temperature (20 ± 2 °C), sexual differentiation conforms strictly to sexual genotype whereas at 32 °C, larvae of female genotype (ZW) become fertile phenotypic males (Houillon and Dournon, 1978; Dournon and Houillon, 1984, 1985). For maximal efficiency, heat treatment must be performed during the thermosensitive period ranging from stage 42 to stage 54 (Fig. 1). The mechanism involved in this particular action of temperature is not well understood. However, it is strongly suggested that steroid production is modified in this situation. The first experi-

mental result that led to such a hypothesis demonstrated that treatment with estradiol benzoate was able to counteract the masculinizing effect of temperature (Zaborski, 1986).

### Aromatase

Due to the role played by steroids in sex differentiation in *Pleurodeles waltl*, a main focus of our lab in the past few years was the study of the estrogen-synthesizing enzyme aromatase. This is a microsomal enzyme complex composed of two polypeptides, aromatase cytochrome P450 and a flavoprotein, NADPH-cytochrome P450 reductase. The NADPH-cytochrome P450 reductase is an ubiquitous protein found in the endoplasmic reticulum of most cell types and is responsible for transferring reducing equivalents from NADPH to any cytochrome P450 with which it comes into contact. Aromatase cytochrome P450 is only expressed in a few cell types, especially in gonads and brain. This subunit of the complex is responsible for binding the C19 steroid substrate (androstenedione and testosterone) and catalyzing the rate-limiting reaction in estrogen biosynthesis which leads to the phenolic A ring typical of estrogens.

### Aromatase and paradoxical effect

Aromatase has been suggested to be responsible for the paradoxical effect observed with testosterone in reptiles with TSD (Pieau, 1974; Wibbels and Crews, 1992). Indeed, aromatase could transform exogenous testosterone to estradiol. In order to test this hypothesis in *Pleurodeles waltl*, we performed treatments with non-aromatizable androgens (Chardard et al., 2003). Such compounds are obtained by the enzyme 5α-reductase which generates dihydrotestosterone (DHT) from testosterone. When applied at 500 µg/l on ZZ larvae during the thermosensitive period, DHT did not affect the differentiation of the gonads: after metamorphosis, dissection revealed testes similar to controls and when reared up to adulthood, such animals were identified as fertile males. As a control, DHT was applied on ZW larvae: it induced masculinization. A similar result was obtained when ZW larvae were treated with DHT metabolites such as 5α-androstane-3α-17β-diol, 5α-androstane-3β-17β-diol and androsterone.

The same masculinizing effect was also observed in experiments where another non-aromatizable androgen was used on ZW larvae: 11β-hydroxy androstenedione (11β-OHA) (400 µg/l). The latter appeared to be more efficient than DHT in its masculinizing effects and less toxic. Although 11β-oxygenated androgens are believed to be natural androgens in teleosts (Borg, 1994), it is not demonstrated in *Pleurodeles*. However, 11β-oxygenated androgens have been detected in gonads of *Triturus cristatus* (Lupo di Prisco et al., 1971, 1972) and *Necturus maculosus* (Bolaffi et al., 1979). Whether these androgens induce sex reversal through androgen receptor binding or through an anti-estrogenic pathway is unknown. However, these results reinforce the idea of an implication of aromatase in the paradoxical effect of testosterone.

### Aromatase and female differentiation

In order to assess the involvement of aromatase in the sex differentiation process, we have quantified its activity (Chardard et al., 1995). This was performed by measuring the $^3H_2O$ released upon conversion of [1β-$^3$H]-androstenedione to estrone, in gonads freshly isolated from larvae at different stages of development.

Whereas a very low and constant aromatase activity is detected in larvae from stage 47, a significant increase in enzyme activity is observed in ZW larvae at stage 52. The difference between ZZ and ZW larvae increases thereafter. At stage 54, the activity of the enzyme is 40-fold higher in female than in male larvae (Fig. 2A). This suggests that aromatase plays a key role in female differentiation and that the difference in activity between males and females at stage 52 might be the first sign of this differentiation, prior to any histological manifestation.

Aromatase activity was also measured in ZZ larvae following treatment with estradiol (Fig. 2B). In these animals that become neofemales, the activity increased at stage 55 that is later than in normal ZW individuals.

The role of aromatase was also studied by the use of aromatase inhibitors that have been shown to induce sex reversal of genetic females (Chardard and Dournon, 1999). It should be noticed that some of these drugs could not be used due to their toxicity on *Pleurodeles* larvae (e.g. miconazole). Some other inhibitors such as aminogluthetimide failed to inhibit aromatase activity even when used at high concentrations (7 mg/l). The best results were obtained with fadrozole which sex-reversed ZW larvae in a dose-dependent manner: 33% of sex reversal using 400 µg/l versus 12% using 100 µg/l. Thus, even if results varied according to the type of inhibitor, there was always a good correlation between aromatase inhibition and sex reversal. This is clearly strengthened by a more detailed analysis of the effects of fadrozole (Fig. 2C). In this experiment, ZW larvae were treated with fadrozole since stage 52 and several animals were analyzed at different stages in order to analyze aromatase activity either alone (stages 52 and 54) or together with gonadal phenotype in differentiated gonads (stages 55 and 56). We observed that aromatase activity was inhibited up to stage 54 in all the individuals. However, at later stages, whereas aromatase activity is maintained at a low level in some animals which differentiate testes, there is an increase in aromatase activity in other animals which escape from the effect of fadrozole and differentiate ovaries.

### Aromatase and temperature-induced sex reversal

Since temperature can sex reverse genetic female larvae (ZW) into fertile neomales on one hand, and since estrogens are able to counteract the effect of temperature on the other hand, it was hypothesized that estrogen production was affected during heat treatment. To confirm this point, experiments were performed to analyze the status of the estrogen producing enzyme aromatase during heat treatment (Fig. 2D). Enzyme activity measurements showed that in ZW larvae reared at

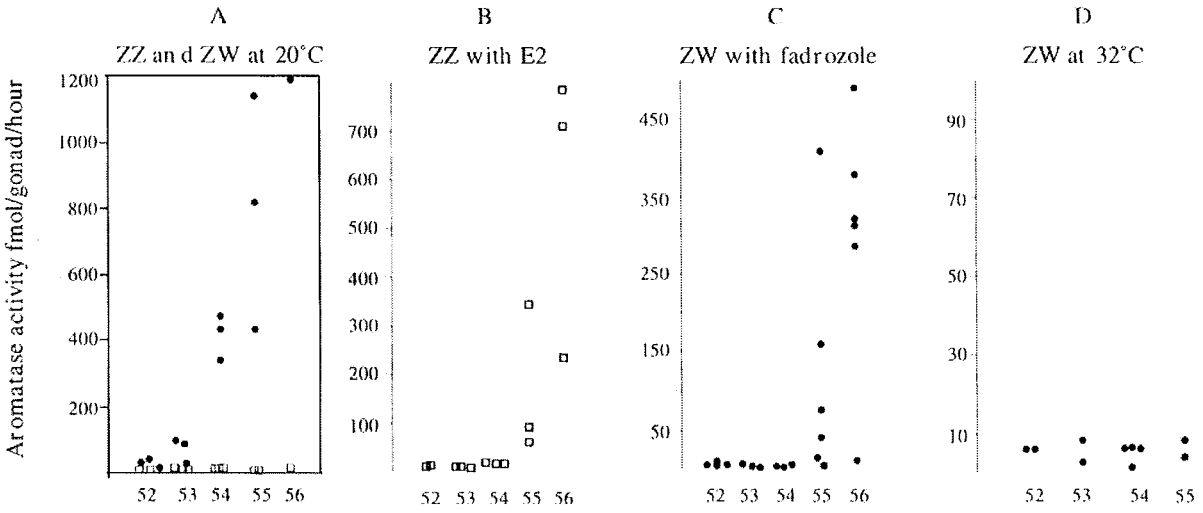



**Fig. 2.** Aromatase activity and gonadal differentiation in *Pleurodeles waltl*. Up to stage 54, aromatase activity was measured by the $^3H_2O$ method in gonads and mesonephros. At stages 55 and 56, the enzymatic activity was measured in one gonad while the other one was subjected to a histological analysis to identify the sexual phenotype. Empty squares show ZZ genotype and filled circles show ZW genotype. **(A)** A significant increase in aromatase activity is observed in control ZW larvae from stage 52 and the difference in the enzyme activity between males and females increases thereafter. **(B)** When ZZ larvae are treated with estradiol, an increase in aromatase activity occurs (stage 55) and gonads differentiate in ovaries. **(C)** When ZW larvae are reared in the presence of fadrozole, two situations are observed: either aromatase activity does not increase and gonads differentiate in testes or aromatase activity increases later than in control larvae (at stage 54) and these larvae escape to sex reversal. **(D)** In ZW larvae reared at 32 °C during the thermosensitive period, this increase does not occur and gonads differentiate in testes.

32 °C from stage 42 to stage 54, i.e. during TSP, there was no increase in aromatase activity in contrast to what occurs in control genetic females (Chardard et al., 1995). Attempting to explain this observation, we expected that it was a result of a decrease in aromatase gene expression and gene expression studies were undertaken (Kuntz et al., 2003).

Hence, the gene encoding aromatase in *Pleurodeles waltl* was cloned. The sequence showed a high homology to sequences already identified in other vertebrates. RT-PCR analyses confirmed what is usually observed in adults of other species since a signal was detected in testis, ovary and brain. In addition, aromatase gene expression was found in the lung. Such a result has never been described in other species and we have no physiological explanation about this up to now.

Qualitative RT-PCR analysis performed during larval development showed that aromatase gene expression appears at the beginning of TSP, at stage 44, in ZZ, ZW and heat-treated ZW larvae. In situ hybridization performed at stage 54 showed that aromatase gene expression was restricted to the gonads, without any signal in other tissues of truncal sections. On the histological sections, the expression appeared stronger in control ZW larvae than in heat-treated ZW larvae, the latter showing a staining identical to that of ZZ males (Kuntz et al., 2003).

Semi-quantitative RT-PCR study of aromatase gene expression failed to detect a significant difference between the three kinds of larvae until stage 54. At this stage, in ZW control larvae, we observed a level of mRNA two-fold higher than that of heat-treated ZW animals. In these larvae reared at 32 °C since stage 42, the level of aromatase mRNA appeared identical to that of ZZ larvae (Kuntz et al., 2003).

Together, the results of the semi-quantitative RT-PCR study and those of in situ hybridization confirmed our hypothesis of a decrease in aromatase gene expression in the condition of temperature-induced sex reversal. However, these results cannot explain the differences in aromatase activity that we reported previously. Indeed, at the enzymatic activity level, differences may be observed between genetic males and genetic females as soon as stage 52. Besides, at stage 54, the difference in aromatase activity between males and females (40-fold) was much more pronounced than the differences observed at the mRNA level (two-fold). Hence, we have to conclude that even if temperature may affect aromatase gene expression, modifications at the post-transcriptional level probably also occur. One might also propose that despite of the absence of high changes at the mRNA level, the level of the protein could be affected in the case of heat treatment. Phosphorylations could also be involved since kinase activators or kinase inhibitors are able to induce fast changes in cerebral aromatase activity in birds (Balthazart et al., 2001). Finally, another hypothesis could be the production of an inhibitor of the enzyme in heat-treated larvae.

## Conclusion

The different studies reported in this paper agree with an important role of aromatase in *Pleurodeles waltl*, not only in female differentiation but also in sex reversal processes such as testosterone-induced feminization of ZZ larvae (paradoxical effect) or temperature-induced masculinization of ZW larvae

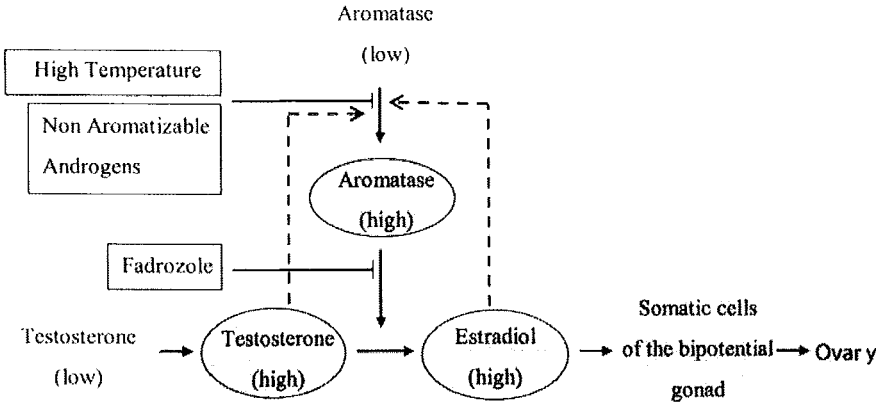



**Fig. 3.** Schematic representation of the role played by steroids and aromatase in *Pleurodeles* sex differentiation. The cascade of several events is described for the ZW genotype. Circled events are important for female differentiation. Among them, the application of either testosterone or estradiol to ZZ larvae induce male to female sex reversal. Boxed are events able to induce female to male sex reversal of ZW larvae. See text for details.

(Fig. 3). This is in agreement with data obtained in other non-mammalian vertebrate species such as fishes or reptiles.

What is more precisely the action of aromatase in sex differentiation? The increase in aromatase activity observed at stage 52 in female larvae could induce an accumulation of estrogens above a threshold that would lead to ovary differentiation. When testosterone is applied on male larvae, the low level of aromatase activity could finally lead to the aromatization of the large amount of androgens and to sufficient accumulation of estrogens which, above the threshold, could trigger female differentiation. Of course, such a result cannot be observed when non-aromatizable compounds are used. This "threshold theory" appears well illustrated by the results of fadrozole treatment of ZW larvae: according to the level of aromatase inhibition, and consequently of estrogen production, larvae can differentiate either into males or females. In *Pleurodeles*, gonads are sensitive for a long time to alterations of the estrogen level: steroid application either during the TSP or after the TSP both induce sex reversal (Chardard et al., 2003).

In regard to this, what does the TSP represent at the molecular and cellular level, i.e. what is the target of temperature? Aromatase expression starts at stage 44 just after the beginning of TSP, but in the gonads we did not detect any difference between control or heat-treated females before stage 52, at either the messenger or the activity level (Chardard et al., 1995; Kuntz et al., 2003). Besides, a 48-hour elevation of rearing temperature from 20°C to 32°C induces a decrease in ZW larvae gonadal aromatase activity at stage 53 (penultimate stage of the TSP) but not at stage 55 (after the end of TSP) (Chardard et al., 1995). These observations suggest that aromatase is probably not the direct target of temperature. Current investigations are in progress to determine if this effect is reproducible in vitro and in other tissues expressing aromatase such as the brain. This could help to understand if the effect of temperature on aromatase expression and activity is restricted to the gonads or if it is a more general process in *Pleurodeles waltl*. It is also important to determine what kind of post-transcriptional modifications are able to affect the production of the enzyme or its activity. In this context, the status and the role of heat shock proteins in the process of temperature-induced sex reversal could be studied. We have begun to analyze this by heavy metal application on *Pleurodeles* larvae during the TSP, as a way to mimic heat stress but this did not induce sex reversal (Flament et al., 2003). Genes of the sex-determining cascade in the gonads could lead to different steroidogenic environment and induce testis or ovary differentiation. Investigations are also performed on these genes as potential targets of temperature.

## References


Balthazart J, Baillien M, Ball GF: Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. J Steroid Biochem Mol Biol 79:261–277 (2001).

Bolaffi JL, Lance V, Callard IP, Walsh JM, Idler DR: Identification of 11-ketotestosterone, 11β-hydroxytestosterone and testosterone in plasma of *Necturus maculosus* (Rafinesque). Gen Comp Endocrinol 38:127–131 (1979).

Borg B: Androgens in teleost fishes. Comp Biochem Physiol 109C:219–245 (1994).

Chardard D, Dournon C: Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. J exp Zool 283:43–50 (1999).

Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dournon C: 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 (1995).

Chardard D, Kuntz S, Chesnel A, Flament S: Effects of androgen on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. J exp Zool 296:46–55 (2003).

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 Dévelop 24:361–378 (1984).

Dournon C, Houillon C: Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. Reprod Nutr Dévelop 25:671–688 (1985).

Dournon C, Houillon C, Pieau C: Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. Int J Dev Biol 34:81–92 (1990).

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).

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

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 Paris Série D 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 Fr Belg 88:1–51 (1954).

Gallien L: Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. Gen Comp Endocrinol, Suppl: 346–355 (1962).

Gallien L, Durocher M: Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl.* Bull Biol Fr Belg 91:97–114 (1957).

Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, McMeel OM, Martin SAM, Fostier A: Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* and a tilapia *(Oreochromis niloticus)*. Mol Reprod Develop 54:154–162 (1999).

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 du phénotype sexuel femelle sous l'action d'une température élevée chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltlii* Michah. C R Acad Sci Paris, Série D 286:1475–1478 (1978).

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 waltl.* J Steroid Biochem Mol Biol 84:89–100 (2003).

Lupo di Prisco C, Delrio G, Chieffi G, Bellini Cardinelli L, Polzonetti Magni A: Identification and biosynthesis of steroid hormones in the ovary and fat bodies of female *Triturus cristatus carnifex*. Comp Biochem Physiol 40 (B):53–60 (1971).

Lupo di Prisco C, Sile CB, Delrio G, Chieffi C: In vitro metabolism of cholesterol-4-14C and testosterone-4-14C in testes and fat bodies of *Triturus cristatus carnifex*. Comp Biochem Physiol 41(B):245–249 (1972).

Picau C: Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'Emys orbicularis L. (chélonien); effets des hormones sexuelles. Ann Embryol Morphol 7:365–394 (1974).

Picau C, Girondot M, Richard-Mercier N, Desvages G, Dorizi M, Zaborski P: Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the european pond turtle: hormonal involvement. J exp Zool 270:86–94 (1994).

Picau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N: Temperature dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. In: Genes and mechanisms in vertebrate sex determination. EXS 117–141 (2001).

Scheib D: Effects and roles of estrogens in avian gonadal differentiation. Differentiation 23 (suppl):587–592 (1983).

Wallace H, Badawy GMI, Wallace BMN: Amphibian sex determination and sex reversal. Cell Mol Life Sci 55:901–909 (1999).

Wibbels T, Crews D: Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. J Endocrinol 133:121–129 (1992).

Zaborski P: Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and HY antigen expression in gonads of a newt. Prog Clin Biol Res 217A:163–169 (1986).

## 3) Etude de l'expression de l'aromatase dans le cerveau pendant la différenciation gonadique

(article soumis pour publication)

### A) Introduction

Chez les espèces dont le déterminisme est sensible à la température, il a été suggéré qu'un facteur thermosensible présent dans le cerveau puisse influencer la différenciation sexuelle. L'aromatase a été supposée être la cible directe ou indirecte de la température. En effet, dans le cerveau du poisson *Oreochromis mossambicus*, la température modifie le niveau de transcrits aromatase durant le processus de la différenciation sexuelle (Tsai C.L. *et al.*, 2003). Chez *Oreochromis niloticus*, la masculinisation de femelles génétiques par une température d'élevage importante entraîne une répression de l'expression de l'aromatase dans les gonades ainsi qu'une baisse de l'activité aromatase d'environ 3 fois dans le cerveau suggérant que ce dernier pourrait aussi intervenir au cours de la différenciation testiculaire (D'Cotta H. *et al.*, 2001b). Chez deux espèces TSD, il a aussi été démontré que l'aromatase cérébrale était sensible à la température. Chez la tortue *Malaclemys terrapin*, le niveau des transcrits aromatase est plus important dans le cerveau femelle par rapport au cerveau mâle au début de la TSP, avant l'augmentation observée dans les gonades femelles (Jeyasuria P. et Place A.R., 1997). Il en est de même chez la tortue *Trachemys scripta* (Willingham E. *et al.*, 2000; Crews D. *et al.*, 2001). Afin de savoir si le cerveau intervient dans la détermination et la différenciation gonadique chez le pleurodèle, nous avons étudié l'activité et l'expression de l'aromatase cérébrale au cours du développement larvaire normal ou obtenu en conditions d'inversion sexuelle induite par la température.

### B) Principaux résultats

Chez de nombreux vertébrés, il a été montré qu'un mécanisme d'épissage alternatif génère des transcrits aromatase avec des régions 5' UTR différentes mais une région codante commune (Bershtein L.M., 1997; Golovine K. *et al.*, 2003; Ramachandran B. *et al.*, 1999). Chez les poissons, sauf pour la raie *Dasyatis sabina* qui contient aussi des 5' UTR différentes (Ijiri S. *et al.*, 2000), deux transcrits aromatase provenant de deux gènes différents ont été isolés dans le cerveau et dans l'ovaire (Kwon J.Y. *et al.*, 2001; Kishida M. et Callard G.V., 2001; Tchoudakova A. et Callard G.V., 1998; Chiang E.F. *et al.*,

2001b). Par conséquent, nous avons commencé notre étude par rechercher l'éventuelle présence d'un transcrit spécifique dans le cerveau. Pour ce faire, une RACE-PCR en 5' a été réalisée sur un cerveau adulte de pleurodèle. Nous avons ainsi isolé un transcrit aromatase présentant une région 5' différente du transcrit gonadique et une région codante identique (Fig.24). Des couples d'amorces spécifiques de chaque isoforme ont ensuite pu être choisi afin d'étudier et de comparer leur expression.

**Figure 24 : Région 5' non codante de l'aromatase cérébrale et gonadique.** Le début de la région codante est représenté en noir. La région 5' non codante du cerveau (C) et de la gonade (G) ont une partie commune qui est en rouge, les parties différentes sont en vert pour le cerveau et bleu pour l'aromatase.

L'étude du profil d'expression de ces isoformes a été débuté dans différents tissus adultes : cerveaux mâles et femelles, testicule et ovaire. L'analyse qualitative a révélé que la forme aromatase cérébrale est majoritaire dans le cerveau alors que la forme aromatase gonadique est majoritaire dans le testicule et l'ovaire.

La même analyse au cours du développement a montré un résultat cohérent au niveau gonadique mais plus discutable au niveau cérébral. En effet, l'isoforme gonadique est majoritaire dans les gonades de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ par rapport à la forme cérébrale. Une analyse par RT-PCR semi-quantitative (26 cycles) a montré que l'expression de l'isoforme gonadique reflète celle de l'aromatase totale dans le complexe gonades-mésonephros au stade 55.

Au niveau cérébral, la détection des isoformes gonadiques et cérébrales est aléatoire et aucune différence n'est observée entre les deux formes. Ainsi, aucune des deux isoformes ne semble être impliquée dans cette expression cérébrale précoce. Une autre forme pourrait exister, spécifiquement larvaire comme chez le porc (Graddy L.G. *et al.*, 2000).

Comme les analyses précédentes conduisent à des expressions aléatoires des deux isoformes dans les cerveaux larvaires, nous avons étudié l'expression de l'aromatase totale cérébrale en utilisant des amorces spécifiques situées dans l'ORF de ce gène. Ainsi, nous avons commencé par une analyse de l'expression de l'aromatase au cours du développement larvaire. Des cerveaux de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$et $ZW^{32}$ ont été prélevés à différents stades du développement (42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 55) et examinés par RT-PCR qualitative (35 cycles). Des transcrits aromatase ont été détectés dès le stade 42 chez les trois types de larves. Ils sont présents dans tous les autres stades étudiés quel que soit le sexe de l'animal et la température d'élevage.

Une analyse par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles) a ensuite été effectuée aux stades 54 et 55 puisque l'augmentation significative du niveau de transcrits aromatase n'est observée qu'à partir du stade 54 dans le complexe gonades-mésonephros (Fig.25A). Comme précédemment, des cerveaux de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$et $ZW^{32}$ ont été prélevés et analysés. Après hybridation, l'intensité des signaux aromatase et Gapdh a été quantifiée et le signal de l'aromatase a été rapporté à celui de la Gapdh. Le ratio aromatase / Gapdh ne présente aucune différence significative entre les sexes et le stade étudié.

Les cerveaux ainsi que les gonades correspondantes de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ ont été prélevés à différents stades de la période thermosensible (46, 50, 54) et au stade 55 afin de mesurer et comparer leur activité aromatase (Fig.25B). Nous n'avons observé aucune différence significative d'activité aromatase cérébrale entre les individus $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ quel que soit le stade étudié alors qu'au niveau gonadique, l'activité augmente dès le stade 50 chez les larves ZW.

L'aromatase ne semble ni être impliquée dans le processus de la différenciation sexuelle, ni être la cible de la température chez *Pleurodeles waltl* puisque les résultats concernant l'expression et l'activité aromatase ne montrent aucune différence significative entre les larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$et $ZW^{32}$.

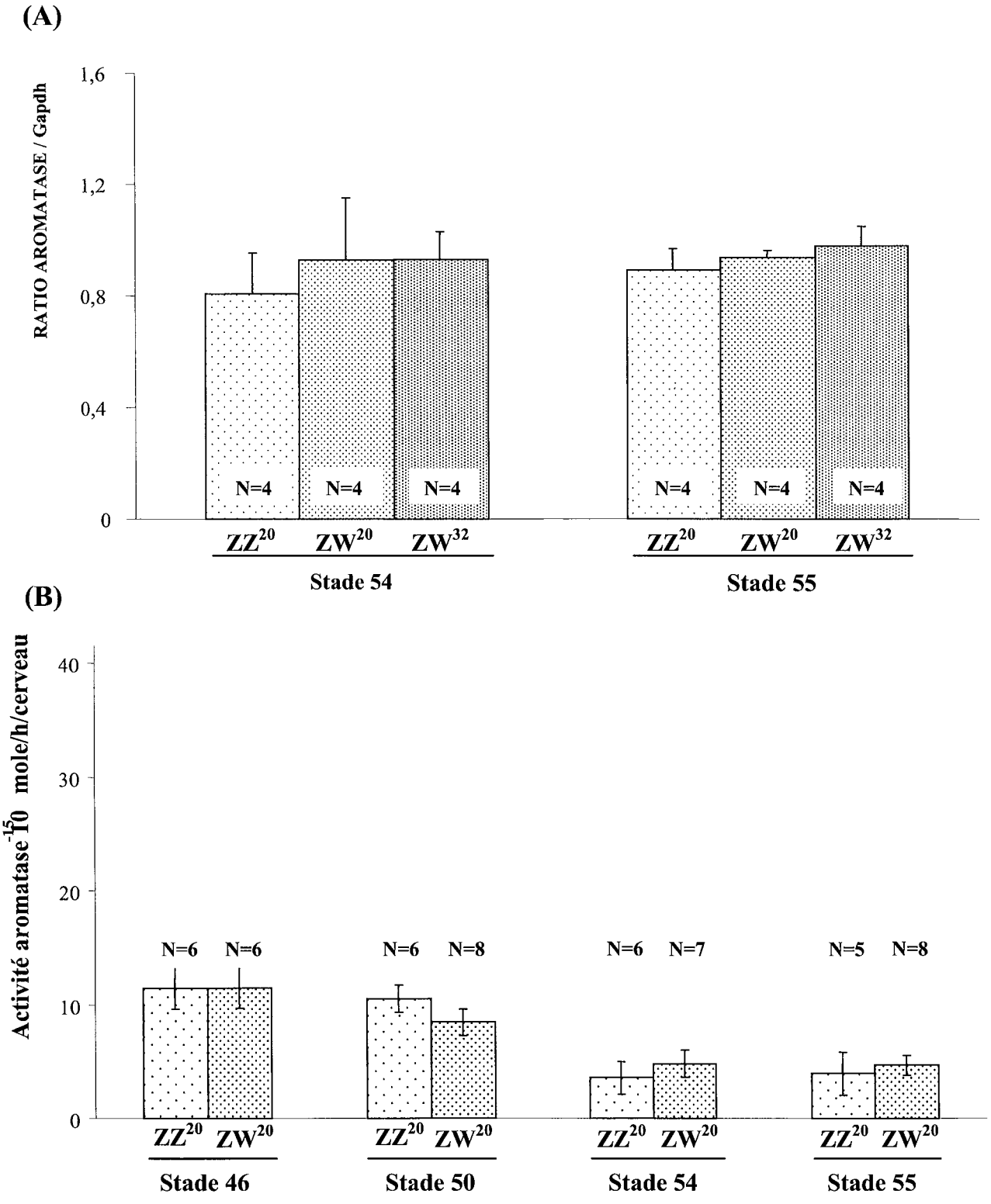



**Figure 25 : Expression (A) et activité aromatase (B) dans le cerveau des larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$.** (A) Les ARNs totaux de quatre complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ aux stades 54 et 55 ont été extraits, rétrotranscrits puis amplifiés par PCR semi-quantitative (28 cycles). Après hybridation, l'intensité du signal aromatase a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. Le nombre de répétitions est indiqué par N. (B) Pour chaque échantillon aux différents stades 46, 50, 52 et 54, l'activité aromatase d'un cerveau de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ a été mesuré. La moyenne des activités est représentée par l'histogramme. Le nombre de répétitions est indiqué par N.

C) Conclusion

Le cerveau ne semble pas intervenir dans la régulation directe ou indirecte de l'aromatase puisque le niveau des transcrits et d'activité de l'aromatase ne sont pas significativement différents entre les larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$. De plus, la température n'agit pas sur l'expression de cette enzyme au niveau cérébral.

Une isoforme cérébrale, isolée à partir d'un cerveau adulte, est différente par la région 5'UTR de l'isoforme gonadique issue d'ovaire ou de testicule adultes. Chaque isoforme est spécifiquement exprimée dans le tissu adulte correspondant. Au cours du développement, la forme gonadique est le transcrit majeur dans les complexes gonades-mésonéphros. Cependant, les cerveaux larvaires présentent une expression aléatoire de ces deux isoformes suggérant l'implication d'une forme larvaire.

# *Article 3.

**Journal of Molecular Endocrinology**

**Submitted May 3, 2004.**

# Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltl*

*Abbreviated title : Cerebral versus gonadal aromatase*

Sandra KUNTZ, Amand CHESNEL, Stéphane FLAMENT and Dominique CHARDARD.

EA 3442 Génétique, Signalisation, Différenciation. Université Henri Poincaré – Nancy I. Faculté des Sciences – BP 239 - 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex - France

*Corresponding author :* Pr. S. Flament

Université Henri Poincaré-Nancy I. Faculté des Sciences. EA3442. Entrée 1B – 9$^{ème}$ étage. Boulevard des Aiguillettes. BP 239. 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex. France.

Phone : 03-83-68-42-52

Fax : 03-83-90-32-77

e-mail : stephane.flament@persmail.uhp-nancy.fr

*Key words*: aromatase, brain, gonad, sex differentiation, *Pleurodeles waltl.*

**Abstract**

In vertebrates, sex is determined by essentially two means, genetic factors located on sex chromosomes and epigenetic factors such as temperature experienced by the individual during the development. Steroids, especially estrogens, are clearly involved in non mammalian vertebrates in gonadal differentiation. In this regard, the expression of the estrogen producing enzyme aromatase has been shown to be thermosensitive in species where temperature can reverse sex differentiation, especially in our model, the amphibian *Pleurodeles waltl*. We investigated here the regulation of aromatase expression in the brain during sex differentiation in Pleurodeles. We first isolated a brain isoform of aromatase mRNA which differs in its 5' untranslated region from the isoform previously isolated from adult gonads. In adult pleurodeles, the brain isoform is mainly expressed in brain tissue while the other is gonad specific. Thus, regulation of aromatase expression in *Pleurodeles waltl* could arise by alternative splicing of non coding exons 1 as previously described in mammals. We investigated then aromatase expression in the brain of male and female larvae and found no differences regarding to sex. Measures of aromatase activity in the brain showed also no differences between sexes at larval stages where activity markedly increases in ovary concurrently to the start of gonadal differentiation. These results support the hypothesis that aromatase could be a target of temperature sex reversing effect in gonads but not in brain.

**Introduction**

The urodele amphibian *Pleurodeles waltl* is an interesting model for the study of vertebrate sex differentiation because in that species, this phenomenon displays a genetic regulation which can be overridden by temperature (Chardard *et al.*, 2004). Indeed, sex determination obeys female heterogamety : males have ZZ sex chromosomes and females have ZW. However, when ZW larvae are reared at 32°C during a thermosensitive period (TSP) ranging from stage 42 to stage 54, they differentiate into functional neomales (Dournon and Houillon, 1985).

As observed in other non mammalian vertebrates, steroid hormones and the estrogen synthesizing enzyme aromatase play a key role in *Pleurodeles waltl* sex differentiation (Kuntz *et al.*, 2003a). Addition to the rearing water of estradiol or aromatizable androgens, such as testosterone, induces male to female sex reversal (Gallien, 1962 ; Chardard *et al.*, 2003). Conversely, non aromatizable androgens, such as dihydrotestosterone, as well as aromatase inhibitors have no effect on ZZ larvae but drive ZW larvae to differentiate as

males (Chardard *et al.*, 2003 , Chardard and Dournon, 1999). Aromatase activity measurements in gonad-mesonephros complexes revealed a higher activity in ZW larvae than in their ZZ counterparts; this difference appears in the last stages of TSP (Chardard *et al.*, 1995). High or low aromatase activity is also concordant with ovarian or testicular differentiation during estradiol- or aromatase inhibitor-induced sex reversal (Kuntz *et al.*, 2003a).

The role of steroids in the sex differentiation process in *Pleurodeles waltl* is also highlighted by temperature-induced sex reversal. For instance, estradiol is able to counteract the masculinizing effect of temperature (Zaborski, 1986). Besides, the increase in aromatase activity that occurs in control ZW larvae from stage 52 is not observed in heat-treated ZW larvae (Chardard et al., 1995). In order to determine if this could be the result of different transcription levels, we have recently cloned the gene encoding *Pleurodeles waltl* $P_{450}$-aromatase from adult gonads (Kuntz et al., 2003b). We have found a 2 fold decrease in aromatase expression in heat-treated versus control ZW larvae at stage 54 (Kuntz et al., 2003b), suggesting that post-translational events are also probably able to explain the high difference (40 fold) in enzymatic activity that is usually observed at this stage (Chardard et al., 1995).

The relationship between steroids and temperature is also evidenced in reptiles with Temperature-dependent Sex Determination (TSD). In this case, the temperature experienced by the egg during a specific window of development establishes the sex of the individual. Incubation temperature is transduced into an endocrine signal, which directs the sex determination process (Crews et al., 1994). The molecular link between temperature and steroid production is unknown but temperature is hypothetized to regulate aromatase expression. The latter determines the steroidogenic environment of the gonads leading to either ovary or testis differentiation, depending upon estrogens (and androgens) concentration. However, in some species, aromatase mRNA is not observed in the genital ridge or in the differentiating gonads during the TSP : the sole aromatase activity detected in the gonad is observed after the temperature sensitive window in the turtles *Trachemys scripta* (Thomas *et al.*, 1992 ; Willingham *et al.*, 2000) and *Lepidochelys olivacea* (Salame-Mendez *et al.*, 1998) as well as in the crocodilians *Alligator mississipiensis* (Smith et al., 1995 ; Milnes et al., 2002) and *Crocodylus porosus* (Smith and Joss, 1994). This suggests that in these TSD species, during early sex differentiation, steroids could have an extragonadal origin.

In addition to the gonads, aromatase is mainly expressed in the brain in which estrogen synthesis occurs in several areas. Indeed, aromatase has been detected in the brain of all vertebrates studied and in mammals, aromatase is involved in maturation of neurons and brain differentiation (Hutchison *et al.*, 1997). The concentration of E2 in the brain of Olive Ridley sea turtle embryos is much higher at feminizing temperature than at masculinizing temperature whereas the gonadal level of this steroid is identical at both temperatures (Salame-Mendez *et al.*, 1998). Sexually dimorphic transcription of the aromatase gene has been detected in the brain of *Malaclemys terrapin* embryos during the early stages of sex determination with a greater abundance in the female brain at the beginning of TSP (Jeyasuria and Place 1998). Aromatase activity measurements in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta* also revealed differences between male and female brains while identical levels were observed in the gonads at the same stage (Willingham et al., 2000). These results indicate that, at least in some TSD species, the brain could be the site of steroid hormone synthesis in response to temperature.

In the same way, in some fishes, temperature could affect sex differentiation via steroid production modulation in brain. Indeed, in the tilapia *Oreochromis mossambicus*, before 10 days post hatching, high temperature significantly increases aromatase mRNA level in the brain while a lower temperature results in a decrease (Tsai *et al.*, 2003). Sequential hermaphroditism is a common feature among marine fishes and in some species, sex reversal is controlled by social cues. It seems reasonable to argue that in these species social stimuli are integrated by the brain and delivered to the whole body, especially gonads.

In our amphibian model *Pleurodeles waltl*, little is known about aromatase in the brain. The present study was performed in order to get more data about it and to determine if cerebral aromatase could be affected by heat-treatment as previously reported for the gonadal isoform.

## Materials and methods

*Animals*

Adults *Pleurodeles waltl* were reared in fresh water at 20±2°C in our laboratory.

ZZ larvae and one group of ZW larvae were maintained at 20°C±2°C ($ZZ^{20}$ and $ZW^{20}$ larvae), temperature at which the sexual genotype and the sexual differentiation are concordant. Another group of ZW larvae was heat-treated at 32°C during the TSP that stands from stage 42 to stage 55 ($ZW^{32}$ larvae) : under this rearing temperature, all larvae differentiate in males. Developmental stages were determined by macroscopic observation according to Gallien and Durocher (1957). The sexual genotype of each individual was identified by electrophoretic patterning of the sex-linked peptidase-1, as described previously (Chardard *et al.*, 1995).

Before dissection, animals were anaesthetized in a solution of benzocaïne (0.03%). In adult animals, aromatase expression was studied in the whole brain and pieces of gonad. In larvae, the analyses were performed in the whole brain and gonad-mesonephros complex. Indeed, at most of the larval stages, gonads could not be dissected alone due to their small size. *In situ* hybridization analyses have shown the absence of aromatase expression in the mesonephros (Kuntz *et al.*, 2003b).

*P450 aromatase cDNA end isolation*

The 5' Rapid Amplification of cDNA End system was used to amplify 5'-end of brain P450 aromatase cDNA (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech). cDNA was synthesized from 1 µg of adult brain total RNA according to manufacturer's instructions. PCR was performed with a specific primer for P450 aromatase 5'-CGCATGACCACGTCCACAACCCGCTG-3'. The reaction mixture was heated at 94°C for 3 min, amplified for the first five cycles at 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, 72°C for 3 min and a final extension at 72°C for 10 min. The amplified products were separated on a 1% agarose gel. A fragment of 1.2 kb was purified (QiaEX II Kit, QIAGEN), inserted into the plasmid pGEM-T easy (Promega) and transfected into *E.coli* TG1 strain. After extraction, the 1.2 kb fragment was restricted and subcloned into pBluescript $KS^{+}$, and a 5' region subclone was sequenced (Genome Express). Two independent clones have been analyzed for 5' RACE P450 aromatase from adult brain.

*RT-PCR analyses*

The detailed protocol for reverse transcription has been described previously (Kuntz *et al.*, 2003b). Total RNA was extracted from the different tissues using TRIzol reagent (Invitrogen) and quantified. Total RNA (3 µg for adult tissue and larval brain ; 1µg for larval gonad-mesonephros complex) was reverse transcribed using hexamer primers and 100 units of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) in a 25 µl total volume. A 2 µl aliquot of resultant cDNA was used for PCR. The amplification was performed with 0.1 unit of Taq DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each dNTP, 2.5 mM $MgCl_2$ and 0.4 pM of each primer in a total volume of 25 µl.

Specific primers for *Pleurodeles waltl* total $P_{450}$-aromatase were 5'-ATTGCAGCACCTGACACGAT-3' and 5'-TTGTTCTGTACATTCTCTAA-3' and led to a PCR product of 510 bp in length (Kuntz *et al.*, 2003b). This product encompasses two exon/intron boundaries based on other vertebrate aromatase genes. In order to amplify specifically the cerebral and the gonadal aromatase isoforms, we designed two primers specific for each 5' untranslated region, AROM-B 5'-AGGGCAAGCAGTGGTAACAA-3', AROM-G 5'- ACGCGGGGACACACTTCTTG -3', and one in the coding region AROM-BG 5'-CTCGAGATGTAGTGTCCATG -3'. The PCR products were 409 bp with AROM-B and 391 bp with AROM-G.

GAPDH was used as a control to ensure that the RNA was not degraded or to prevent poor transcription quality, (primers 5'- ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3' and 5'-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3' leading to a 290 bp fragment). The PCR conditions were 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing, 1 min elongation at 72°C. Annealing temperature was 52°C for total aromatase and gapdh. PCR conditions for 5'-part of aromatase were 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing, 2 min elongation at 72°C. Annealing temperatures were 56°C for AROM B-BG and 58°C for AROM G-BG. We realized 35 cycles for qualitative analyses instead of 26 or 28 cycles for semi-quantitative analyses in gonads and brain respectively.

PCR products (10 µl) were run in a 1% agarose gel and either observed directly or transferred to nylon membrane (Hybond-N, Amersham) before hybridization with DIG-labeled probes and detection by chemoluminescence using standard conditions (Kuntz *et al.*, 2003b). The intensity of the hybridization signal was measured by the use of the GelDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories) and a software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories). The relative amounts of $P_{450}$-aromatase mRNA were normalized to GAPDH.

*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-$^{3}$H] androstenedione was measured and enzymatic activity calculated and expressed in femtomoles of estrone produced per hour.

*Statistical analysis*

The results are expressed as mean +/- standard error of several experiments as indicated in the text. Data were analyzed by means of Student's t-test.

## Results

### Isolation of a brain isoform of P450 aromatase cDNA

Since two aromatase isoforms have been found in brain and ovary of fish species, we hypothetized that a similar situation could exist in *Pleurodeles*. So, 5' RACE PCR was performed from total RNA extracted from adult brain. A clone of 1.2 kb was isolated and sequenced (Fig.1). The entire coding region was similar to those of the isoform that we characterized previously from adult *Pleurodeles* gonads (Kuntz *et al.*, 2003b). However, the sequence of the 5' untranslated region was different. Ovarian aromatase cDNA includes a short 5' untranslated region of 45 bp whereas those of brain aromatase cDNA is 83 bp long. Only the 26 bp upstream of the ATG initiation codon were identical.

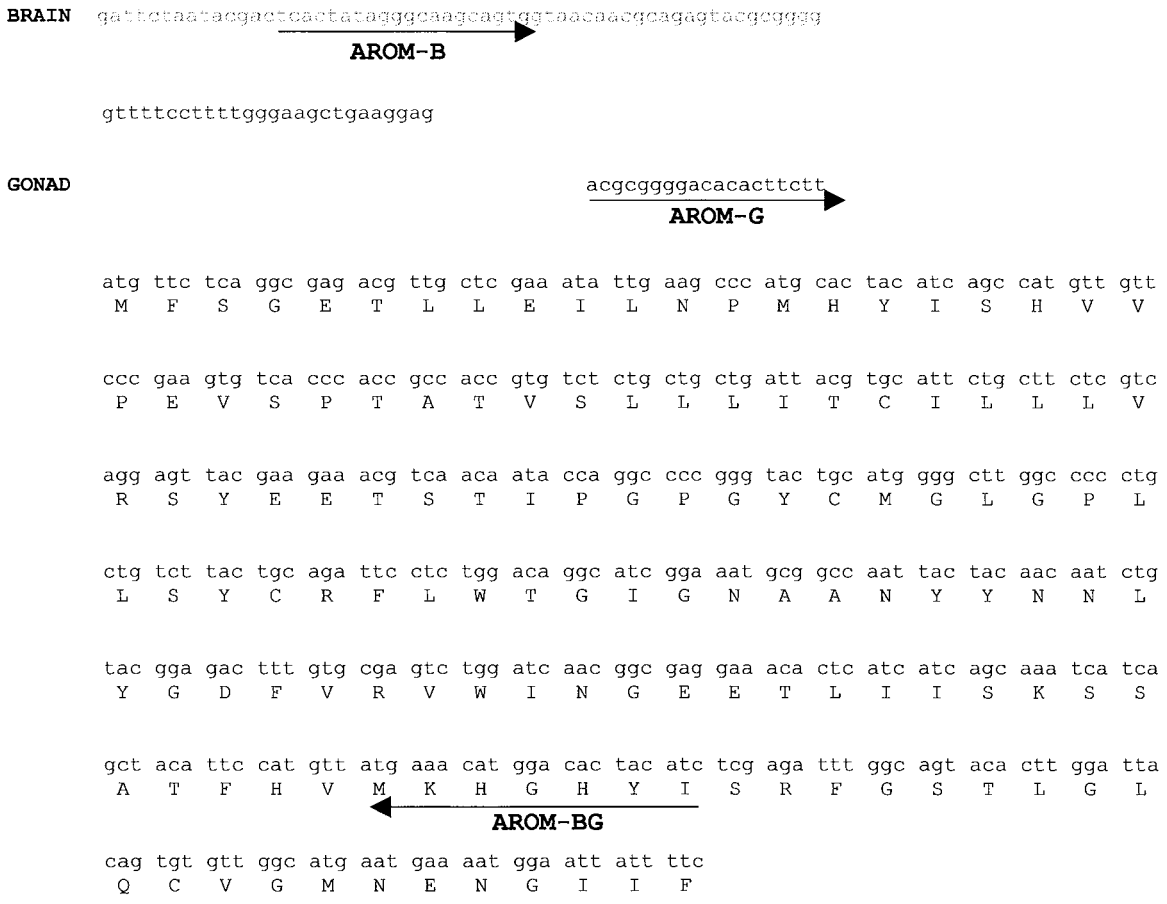



**FIGURE 1.** 5'-end sequences of *Pleurodeles waltl* aromatase cDNAs isoforms. The previously characterized ovarian aromatase cDNA is aligned with those isolated from adult *Pleurodeles* brain. The latter is longer than the ovarian form due to different 5'-UTR. The primers used for different PCR are arrowed.

**Tissue specific expression of P450 aromatase in adult *Pleurodeles***

The expression pattern of brain and ovarian aromatase mRNA isoforms in brain and gonads of adult animals was studied by qualitative RT-PCR (Fig.2), using primers able to amplify specifically each of them (see Fig.1). The two isoforms were detected both in brain and gonads although in different amount : the brain isoform is mainly expressed in male and female brain whereas the ovarian form is predominantly detected in testis and ovary.

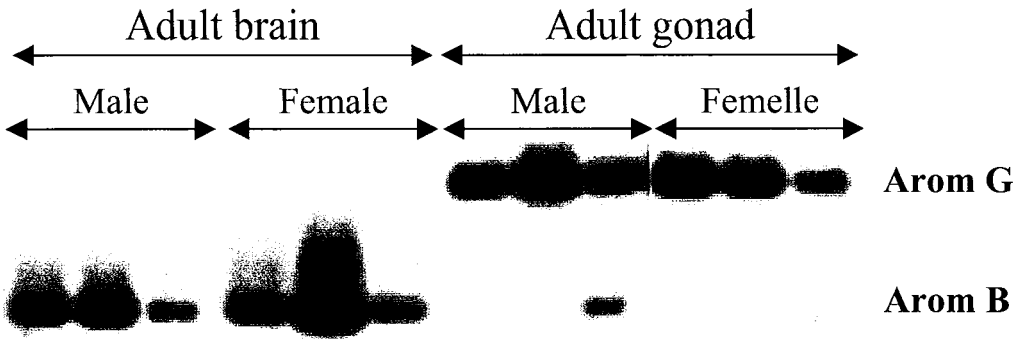



**FIGURE 2.** Expression pattern of two aromatase isoforms in *Pleurodeles waltl* adult brain and gonads. Total RNA was extracted from brain and gonads of 3 adult males and 3 adult females, reverse transcribed and amplified by PCR for 35 cycles. Arom B and Arom G correspond to the brain and the ovarian isoform respectively.

**Cerebral and gonadal expression of aromatase in *Pleurodeles* larvae**

In gonad-mesonephros complexes, aromatase mRNA could be detected using the gonad specific primers whatever the sex of the larvae the developmental stage or the rearing temperature (not shown). A semi-quantitative RT-PCR was performed at stage 55 using primers that amplify specifically the gonadal isoform (Fig.3). We observed that the level of gonadal aromatase mRNA was significantly higher in $ZW^{20}$ larvae than in $ZZ^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae, reflecting what had already been observed using primers designed in the coding region (Kuntz *et al.*, 2003b). In contrast, a low and sparse expression of the brain isoform was observed in larval gonads independently of sex and rearing temperature of larvae, even when a 35 cycles PCR was used (not shown).

In the brain, with 35 PCR cycles and primers specific of each aromatase isoform, we detected only sparse signals (not shown) perhaps because of a low aromatase expression in larval brain. So, we studied total aromatase expression in the brain with primers located in the ORF.

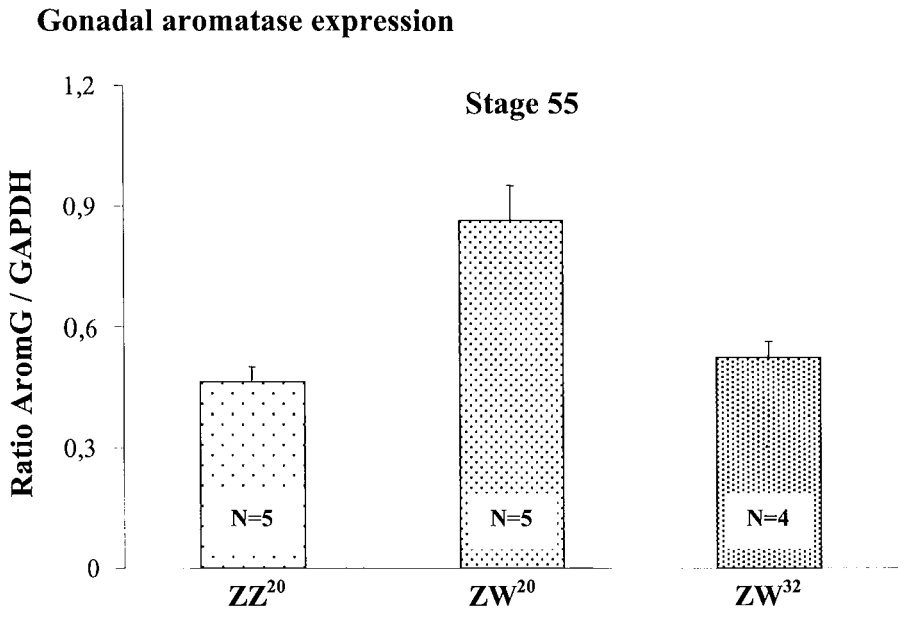



**FIGURE 3.** Semi-quantitative analysis of gonadal aromatase isoform expression in gonads of larvae at stage 55. Relative amount of P450-aromatase mRNA was normalized to GAPDH. Values are means of replicates (one replicate is a pool of 5 animals), the number of which is indicated by N. Vertical bars indicate the mean standard error.

### P450 aromatase expression in the brain during TSP

Aromatase expression in brain was analyzed by qualitative RT-PCR during a window of development ranging from stage 42 to stage 55 including the TSP. We analyzed ZZ and ZW larvae but also ZW larvae exposed to 32°C since stage 42. Aromatase mRNAs were detected in the brain as soon as stage 42. The level of aromatase expression appeared low at the first stages of TSP, however the expression was observed in the three types of larvae at all the stages studied (Fig.4).

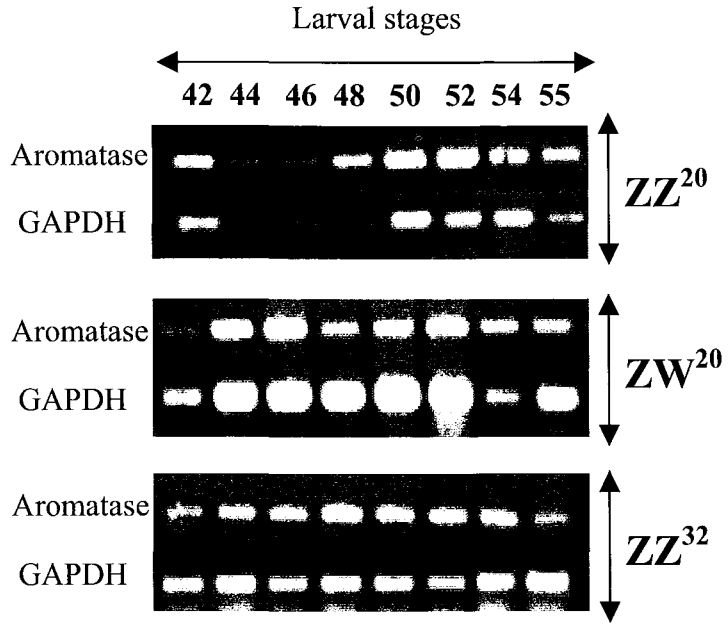
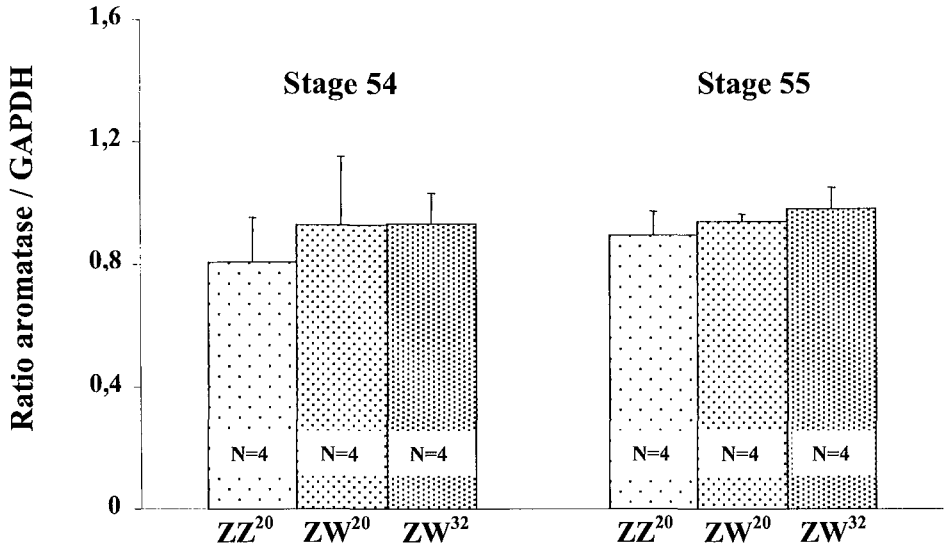



**FIGURE 4.** Qualitative RT-PCR analysis of P450 aromatase expression in the brain of *Pleurodeles* larvae. The presence of P450 aromatase transcripts was studied at different stages : 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 55. Total RNA was isolated from brain larvae, reverse transcribed and amplified by PCR for 35 cycles. Three kinds of larvae were used : $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$. GAPDH serves as a positive control.

**Brain aromatase expression and activity are neither sex-specific nor temperature sensitive**

The level of aromatase mRNAs in the brain of the different larvae was studied using semi-quantitative RT-PCR. In our previous studies, we showed that, in the gonads, no difference in the level of aromatase expression between the different batches of larvae could be observed prior to stage 54 (Kuntz et al., 2003b). In the brain (Fig.5A), aromatase expression was not significantly different between $ZZ^{20}$ and $ZW^{20}$ larvae neither at stage 54 nor at stage 55. Temperature has no effect on brain aromatase expression since no significant difference was observed between $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae at both stages. In contrast, in gonad-mesonephros complexes, aromatase mRNA level was 1,5 fold higher in $ZW^{20}$ larvae than in $ZZ^{20}$ ($p=0,04$) or $ZW^{32}$ larvae ($p=0,006$) at stage 54 (Fig.5B). At stage 55, the level of expression was 2.8-fold higher in $ZW^{20}$ larvae than in $ZZ^{20}$ ($p=3.10^{-6}$) or $ZW^{32}$ larvae ($p=0,0003$). No significant difference was observed between $ZZ^{20}$ larvae and $ZW^{32}$ larvae at both stages.

**(A) Brain aromatase expression**




**(B) Gonadal aromatase expression**

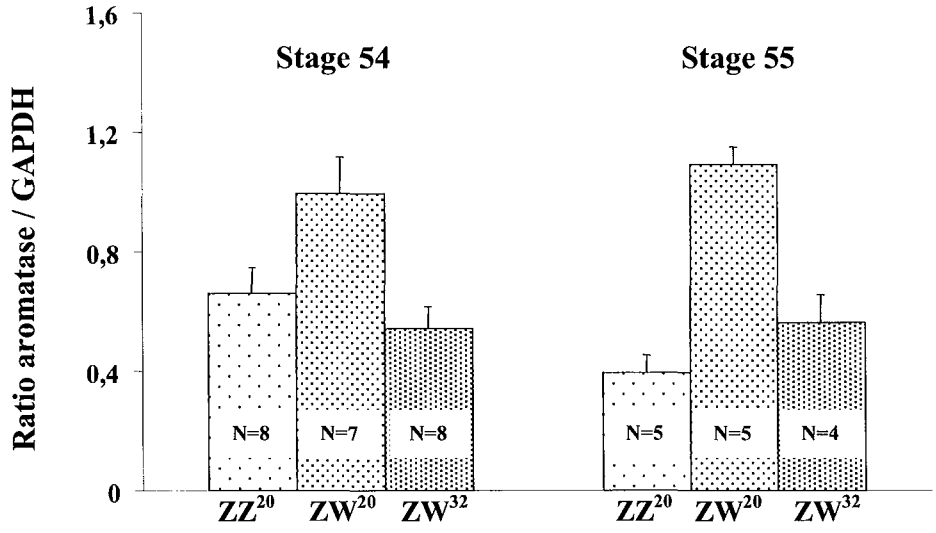
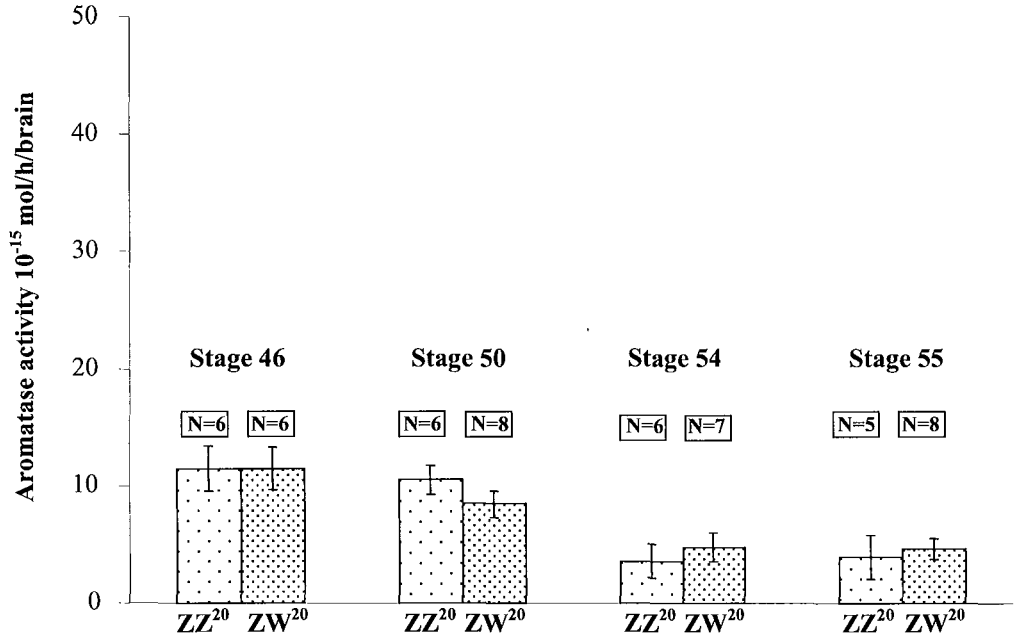



**FIGURE 5.** Semi-quantitative analysis of aromatase expression in brain (A) versus mesonephros+gonads (B) of larvae at stage 54 and 55. Relative amount of P450-aromatase mRNA was normalized to GAPDH. Values are means of replicates (one replicate is a pool of 4 animals for the brain, 5 animals for the mesonephros+gonad), the number of which is indicated by N. Vertical bars indicate the mean standard error.

Aromatase activity was measured in the whole brain of $ZZ^{20}$ and $ZW^{20}$ larvae at stages 46, 50, 54 and 55 (Fig. 6A). Both sexes showed a low activity with no difference at either tested stage. This result is in contrast to that observed in the differentiating gonads of the same individuals where a high difference appears between $ZZ^{20}$ and $ZW^{20}$ larvae at stages 54 and 55 (Fig. 6B).

**(A) Brain aromatase activity**




**(B) Gonadal aromatase activity**

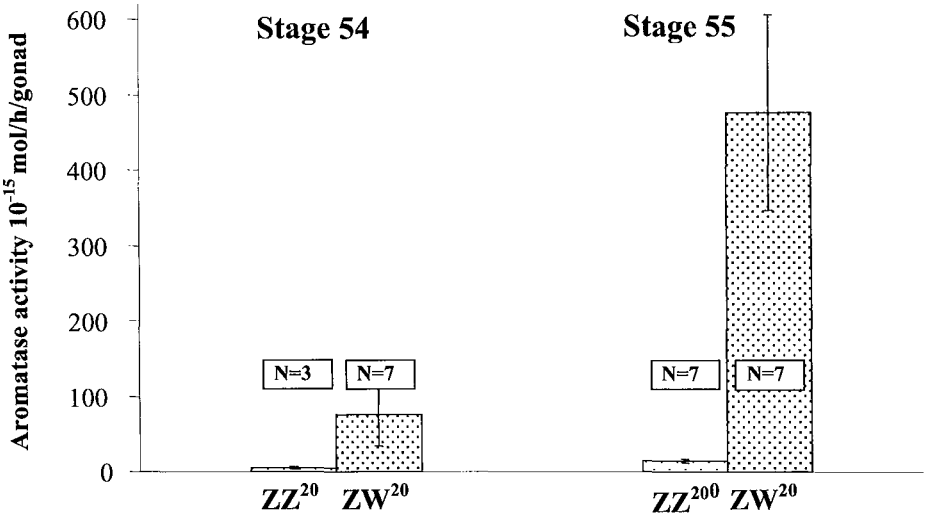



**FIGURE 6.** Aromatase activity in whole brain (A) and mesonephros+gonads (B) of Pleurodeles larvae. Activity was measured with the tritiated water method and expressed in fentomoles of estrone produced/h/organ. Values are means of replicates (one animal/replicate), the number of which is indicated by N. Vertical bars indicate the mean standard error.

**Discussion**

Steroids play a decisive role in non mammalian vertebrates sex differentiation, especially estrogens in female differentiation. Treatments of embryos or larvae with estrogens or endocrine disruptors or mimetics are well known to induce sex reversal in all non mammalian vertebrates. This has been observed in species where sex is genetically determined: birds (Elbrecht and Smith, 1992), amphibians (Gallien, 1962, Hayes, 1998), teleosts (Baroiller and D'Cotta, 2001). This is also true in species where temperature is the only known sex determining factor (Pieau *et al.*, 2001) or where temperature superimposes on a genetic sex determination system (Kuntz *et al.*, 2003a). In these cases, a correlation between temperature and estrogen production has been described : efficiency periods of both factors are concordant and antagonistic effects of temperature and estrogens have been observed (Crews, 1996 ; Pieau *et al.*, 2001; Chardard *et al.*, 2004). All these observations led to the hypothesis that temperature determines steroidal environment of the gonads by negatively regulating aromatase. However, the site of temperature action is unknown : does it act directly on the gonad or another target?

In some turtles (Thomas *et al.*, 1992; Willingham *et al.*, 2001, Salame-Mendez *et al.*, 1998) and crocodilians (Smith and Joss, 1994, Smith *et al.*, 1995, Milnes *et al.*, 2002), aromatase activity and expression in the gonad do not show any difference between males and females either before the end of TSP, or even later. In such species, differences between male and female embryos have been described in the brain which is an other major aromatase expressing organ. In the TSD turtle *Chelydra serpentina*, aromatase mRNA level in the brain is higher at masculinizing temperature than at feminizing temperature (Place *et al.*, 2001). Conversely, in other thermosensitive species, aromatase is female specific in the brain. In the TSD turtle, *Malaclemys terrapin*, aromatase mRNA level is higher at feminizing temperature than at masculinizing temperature and this difference arises earlier than in gonads (Jeyasuria *et al.*, 1998). The same result has been obtained at the activity level in another turtle *Trachemys scripta* (Willingham *et al.*, 2000). In the same way, in the fish tilapia, brain aromatase activity is higher in females than in males and these differences are sensitive to sex-reversing temperatures (D'Cotta *et al.*, 2001 ; Tsai *et al.*, 2003). In all these species, temperature could act directly on the brain which would then transfer the information to the gonad : indeed, the central nervous system mediates physiological responses to many environmental factors in post natal organisms. However, the link between brain and gonads during sex differentiation needs further investigations.

In mammals, the aromatase encoding gene, *cyp19*, has multiple tissue-specific promoters and alternative first exons (Simpson *et al.*, 1994). In fishes, there is at least two distinct *cyp19* loci, *cyp19b*/P450aromB expressed at high level in brain and *cyp19a*/P450aromA in ovary (Tchoudakova and Callard, 1998 ; Kishida and Callard, 2001). In the present work, we identified in *Pleurodeles* two cDNA encoding aromatase which differ only in their 5' UTR, suggesting the use of an alternative untranslated exon 1 such as observed in mammals. In adults, the first isoform, aromG, is expressed at a high level in gonads and at a low level in the brain, while the other one, aromB is highly expressed in the brain. However, in the brain of larvae, we did not succeed to detect a steady expression of either isoform. This result was not due to a low level of aromatase expression in the brain since it was not confirmed by the analysis of total aromatase mRNA obtained with primers located in the translated region. We were indeed able to detect aromatase even in samples where the specific primers were not efficient. This difference might be explained by the expression of a larval isoform of brain aromatase which could have a different 5'UTR.

We found in the brain an early aromatase expression as soon as the beginning of TSP at stage 42, as observed for the gonads (Kuntz *et al.*, 2003b). However, in contrast to gonads, we did not find any difference between male and female larvae brains in their level of aromatase transcripts. Activity measurements confirmed this : a low activity, comparable to the activity of male gonads, is detected with no difference between males and females neither during TSP (stages 46 and 50) nor at the end of this period (stages 54 and 55) when ovary differentiation is already initiated. In the same way, in *Alligator mississipiensis*, no difference in aromatase activity was detected in the brain until late TSP, as observed in gonads. Moreover, embryos incubated at male producing temperature and treated simultaneously with estradiol develop as females with an intermediate aromatase activity in gonads and a masculinized brain activity. This does not support an effect of brain on gonad differentiation in alligator (Milnes *et al.*, 2002). Ancient decapitation experiments in embryos of two other species of reptiles already suggested that gonadal sex determination is independent of the brain (Raynaud, 1962 ; Dufaure, 1966). If this is a general case for vertebrates, differences in aromatase expressing cells in the brain of thermosensitive species could simply reflect sex differentiation of the brain itself. Indeed, estrogen sensitive (estrogen receptor expressing) and estrogen forming (aromatase expressing) networks of neurons have been described in a large number of species. For example, in mammals, where gonadal differentiation is steroid independent, there is a sex difference in aromatase expression in the developing brain (Hutchison *et al.*, 1997).

In *Pleurodeles waltl*, we observed that aromatase expression was not different between $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ brain larvae in contrast to the downregulation observed in gonads of heat-treated larvae. This suggests that temperature has no effect on brain aromatase and excludes the brain as a thermosensitive organ inducing gonadal sex differentiation as a secondary event. In the same way, in the turtle *Lepidochelys olivacea*, the expression of SOX9, a testis differentiation gene, is regulated by temperature in isolated gonads in culture, showing that gonads have an autonomous temperature detector (Moreno-Mendoza *et al.*, 2001). Experiments on isolated gonads are actually under investigation in order to state about the role of the brain in thermal sex reversal of *Pleurodeles waltl*.

**Acknowledgments**

We would like to thank M Callier for technical assistance and Doctor J. Magdalou and M-H Piet for their help in radioactivity measurements. These studies were supported by grants of the « Ligue Contre le Cancer, comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et des Vosges », of the « Association pour la Recherche sur le Cancer » of the « Conseil Régional de Lorraine » and of the "Université Henri Poincaré".

## References

Baroiller JF & D'Cotta H 2001 Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* **130(C)** 399-409.

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. *General and Comparative Endocrinology* **99** 100-107.

Chardard D, Kuntz S, Chesnel A & Flament S 2003 Effects of androgens on sex differentiation of the urodele Pleurodeles waltl. *Journal of Experimental Zoology* **296** 46-55.

Chardard D, Penrad-Mobayed M, Chesnel A, Pieau C & Dournon C 2004 Thermal sex reversals in amphibians. In *Temperature Dependent Sex Determination*, Eds N Valenzuela & V Lance. Smithsonian Institution Press. In press

Chardard D & Dournon C 1999 Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt Pleurodeles waltl. *Journal of Experimental Zoology* **283** 43-50.

Crews D, Bergeron JM, Bull JJ, Flores D, Tousignant A, Skipper JK & Wibbels T 1994 Temperature dependent sex determination in reptiles : proximate mechanisms, ultimate outcomes and practical applications. *Developmental Genetics* **15** 297-312.

Crews D 1996 Temperature dependent sex determination : the interplay of steroid hormones and temperature. *Zoological Science* **13** 1-13.

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

Dournon C & Houillon C 1985 Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'Amphibien Urodèle, *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. *Reproduction Nutrition développement* **25** 671-688.

Dufaure J.P. 1966 Recherches descriptives et expérimentales sur les modalités et facteurs du développement de l'appareil génital chez le lézard vivipare (Lacerta vivipara, Jacquin) **55** 437-537.

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

Gallien L 1962 Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. *General and Comparative Endocrinology* **Suppl** 346-355.

Gallien L & Durocher M 1957 Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltl. *Bulletin Biologique France et Belgique* **91** 97-114.

Hayes T 1998 Sex determination and primary sex differentiation in amphibians : genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology* **281** 373-399.

Hutchison JB, Beyer C, Hutchison RE & Wozniak A 1997 Sex differences in the regulation of embryonic brain aromatase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **61** 315-322.

Jeyasuria P & Place A 1998 Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). *Journal of Experimental Zoology* **281** 428-449.

Kishida M & Callard GV 1998 Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (Danio rerio) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* **142** 740-750.

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.

Milnes MR, Roberts RN & Guillette LJ 2002 Effects of incubation temperature and estrogen exposure on aromatase activity in the brain and gonads of embryonic alligators. *Environment and Health Perspectives* **110 Suppl 3** 393-396.

Moreno-Mendoza N, Harley VR & Merchant Larios H 2001 Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of Lepidochelys olivacea, a species with temperature sex determination. *Developmental Biology* **229** 319-326.

Pieau C, Dorizzi M, & Richard-Mercier N 2001 Temperature dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. In *EXS91 Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination* Scherer G, Schmid M eds,117-141 Birkhauser, Basel, Boston, Berlin.

Place AR, Lang J, Gavasso S & Jeyasuria P 2001 Expression of P450arom in *Malaclemys terrapin* and *Chelydra serpentina* : a tale of two sites. *Journal of Experimental Zoology* **290** 673-690.

Raynaud A 1962 Le développement de l'embryon d'orvet (Anguis fragilis L.) décapité à un stade précoce. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences de Paris* **255** 3041-3043.

Salame-Mendez A, Herrera-Munoz J, Moreno-Mendoza N & Merchant-Larios H 1998 Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle Lepidochelys olivacea. *Journal of Experimental Zoology* **280** 304-313.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MN, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR & Bulun SE 1994 Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews* **15** 342-355.

Smith CA & Joss JM 1994 Steroidogenic enzyme activity and ovarian differentiation in the saltwater crocodile, Crocodylus porosus. *General and Comparative Endocrinology* **93** 232-245.

Smith CA, Elf PK, Lang JW & Joss JMP 1995 Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos. *Differentiation* **58** 281-290.

Tchoudakova A & Callard GV 1998 Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* **139** 2179-2189.

Thomas EO, Licht P, Wibbels T & Crews D 1992 Hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with sexual differentiation in embryos of the turtle Trachemys scripta. *Biology of Reproduction* **46** 140-145.

Tsai CL, Chang SL, Wang LH & Chao TY 2003 Temperature influences the ontogenic expression of aromatase and estrogen receptor mRNA in the developing tilapia (Oreochromis mossambicus) brain. *Journal of Neuroendocrinology* **15** 97-102.

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.

Zaborski P 1986 Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and HY antigen expression in gonads of a newt. In *Progress in Developmental Biology* Part A pp163-169. Alan R Liss, Inc.

## 4) Présence de transcrits aromatase dans le poumon adulte chez *Pleurodeles waltl*

(«Expression of aromatase and steroidogenic factor 1 in the lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*» Kuntz *et al.*, 2004)

### A) Introduction

Chez les animaux adultes, l'aromatase est une enzyme qui joue un rôle important dans la fonction de reproduction. A ce stade, elle est principalement détectée dans le testicule, l'ovaire et le cerveau (Bershtein L.M., 1997; Golovine K. *et al.*, 2003; Jeyasuria P. et Place A.R., 1997; Dalla V.L. *et al.*, 2002). D'autres sites présentant une expression plus faible ont été rapportés comme le rein chez la raie, *Dasyatis sabina* (Ijiri S. *et al.*, 2000), la rate chez le poisson *Paralichthys olivaceus* (Kitano T. *et al.*, 1999), le foie, le cœur et le rein chez *Xenopus laevis* (Miyashita K. *et al.*, 2000) et le cœur chez l'anguille *Anguilla japonica* (Ijiri S. *et al.*, 2003). Chez le pleurodèle adulte, l'aromatase est également exprimée dans le cerveau, le testicule et l'ovaire (voir partie résultats I.1). En plus, nous avons observé des transcrits aromatase dans le poumon. Ce site d'expression particulier n'a encore jamais été décrit et ne présente *a priori* aucune explication physiologique. Afin de confirmer et de mieux comprendre cette expression pulmonaire, nous avons entrepris une analyse plus précise de cet organe. Nous avons aussi recherché et mis en évidence la présence de transcrits aromatase dans le poumon adulte d'un autre amphibien *Xenopus laevis*, ce qui laisse supposer que le poumon des amphibiens possède une fonction stéroïdogénique. Afin de consolider cette hypothèse, l'expression de Sf1 dans ce tissu a été étudiée car ce facteur de transcription est également exprimé dans les tissus impliqués dans la stéroïdogénèse comme les gonades, les surrénales et le cerveau (Hatano O. *et al.*, 1994; Smith C.A. *et al.*, 1999a). Il est particulièrement impliqué dans la régulation de la transcription de nombreuses enzymes exigées pour la production de stéroïdes et notamment, il active la transcription de l'aromatase (Val P. *et al.*, 2003; Lynch J.P. *et al.*, 1993; Michael M.D. *et al.*, 1995).

### B) Principaux résultats

Une première analyse par RT-PCR qualitative (35 cycles) réalisée sur différents organes adultes a confirmé la présence de transcrits aromatase dans le testicule, l'ovaire, le cerveau et le poumon. Les analyses suivantes ont été effectuées sur ces quatre tissus dont

des fragments ont été prélevés chez des mâles et des femelles en vue d'un examen par RT-PCR semi-quantitative (26 cycles). Après révélation par hybridation, nous avons quantifié et rapporté le signal aromatase à celui de la Gapdh (Fig.26A). Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative d'expression entre les individus mâles et femelles pour chaque tissu étudié. Le ratio aromatase / Gapdh n'est pas différent si l'on compare les poumons et les cerveaux, mais il est significativement inférieur à celui mesuré dans les gonades. Ces résultats ont été confirmés par les mesures d'activité aromatase sauf pour les gonades où l'ovaire présente une activité significativement plus importante par rapport au testicule. L'activité enzymatique de ce dernier n'est pas différente de celle des cerveaux et des poumons.

La deuxième partie du travail a concerné le facteur de transcription Sf1 qui a déjà été cloné et séquencé chez notre modèle (voir partie résultat II.1). Une étude d'expression similaire à celle de l'aromatase a été effectuée au niveau des différents tissus adultes. Par RT-PCR qualitative (35 cycles), nous avons observé des transcrits Sf1 dans le testicule, l'ovaire, la rate, le cerveau, le rein et le poumon. Comme pour l'aromatase, l'analyse par RT-PCR semi-quantitative (26 cycles) a été réalisée sur des cerveaux, gonades et poumons d'individus mâles et femelles (Fig.26B). Comme dans l'étude précédente, aucune différence d'expression n'a été détectée entre les tissus mâles et femelles. En revanche, le niveau de transcrits Sf1 est significativement plus important dans les gonades par rapport aux poumons et aux cerveaux. Le niveau de transcrits Sf1 quantifié dans les poumons n'est pas significativement différent de celui mesuré dans les cerveaux.

Dans la dernière partie de l'étude, nous avons recherché la présence de transcrits aromatase dans le poumon d'un autre amphibien *Xenopus laevis*. La séquence de ce gène a été récemment isolée chez cette espèce par d'autres auteurs mais l'analyse des différents tissus adultes n'incluait pas le poumon (Miyashita K. *et al.*, 2000). Ainsi, le poumon d'un xénope femelle a été prélevé et analysé par RT-PCR qualitative (35 cycles). Un signal a été détecté dans ce tissu démontrant que les transcrits aromatase sont également présents dans le poumon de cet amphibien.

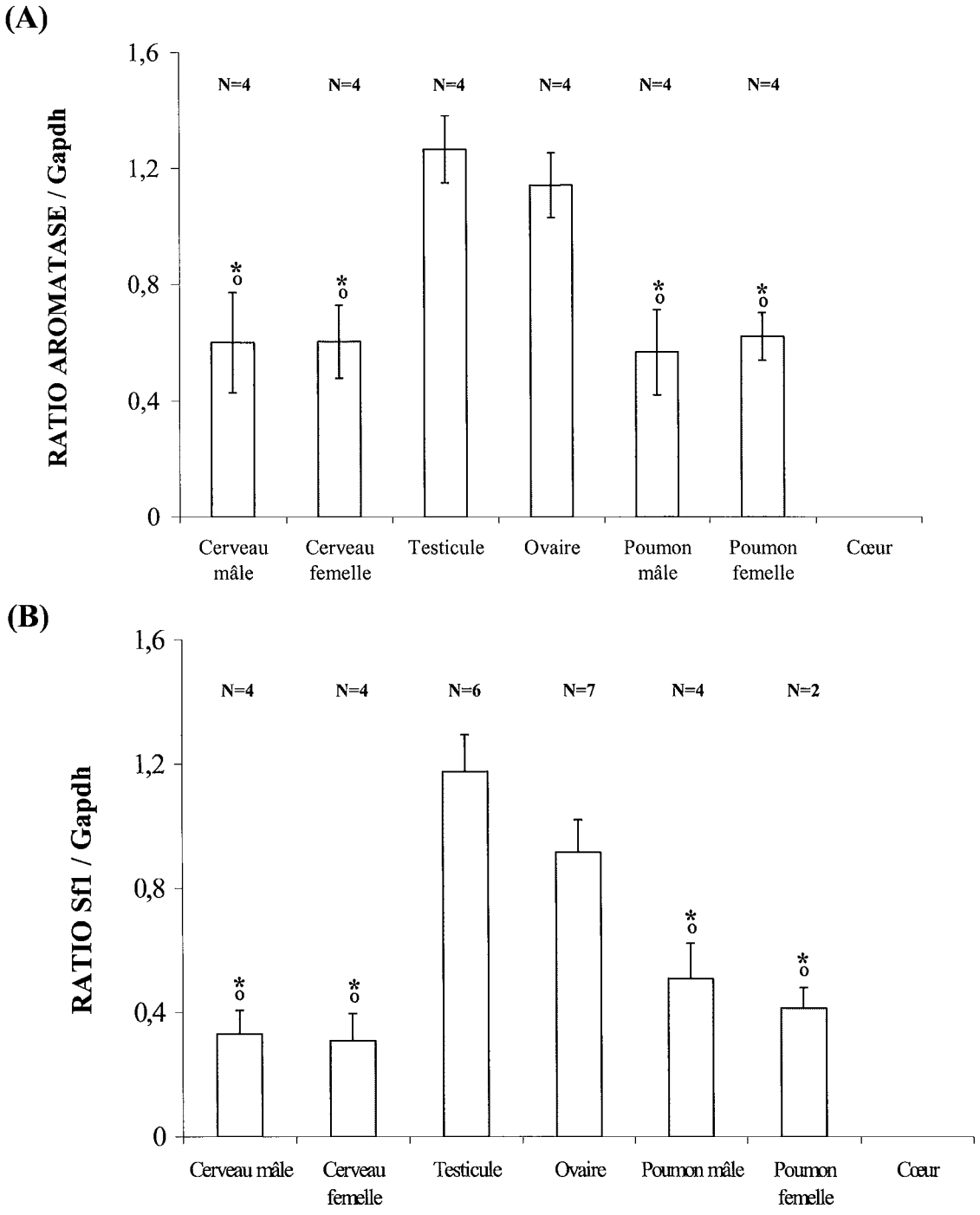



**Figure 26 : Expression de l'aromatase (A) et de Sf1 (B) dans les cerveaux, gonades, coeurs et poumons de pleurodèles adultes.** Un fragment de chaque tissu adulte a été prélevé, extrait puis 3 µg ARN totaux ont été rétrotranscrits et amplifiés par RT-PCR semi-quantitative (26 cycles). Après hybridation, l'intensité du signal aromatase ou Sf1 a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. La moyenne des rapports est présentée sur l'histogramme. L'écart-type moyen est représenté par une barre. Le nombre de répétitions est indiqué par N. *, $P<0,05$ *vs.* ovaire et °, $P<0,05$ *vs.* testicule. (A) Expression de l'aromatase dans les différents tissus adultes. (B) Expression de Sf1 dans les différents tissus adultes.

C) Conclusion

La présence de transcrits aromatase dans le poumon adulte a été démontrée chez deux espèces d'amphibiens : *Pleurodeles waltl* et *Xenopus laevis*. C'est la première fois que l'on décrit une expression d'aromatase dans le poumon de vertébrés non-mammaliens. De plus, Sf1, un régulateur important de la stéroïdogénèse est également présent dans le poumon du pleurodèle. Le rôle exact de la présence de l'aromatase et de Sf1 dans le poumon est encore inconnu et reste à clarifier.

# *Article 4.

balt3/zee-end/zee-end/zee00704/zee0291-04a | saylora | S=4 | 4/27/04 | 8:16 | Art: 1158438 | Input-cd

0013-7227/04/$15.00/0
Printed in U.S.A.

Endocrinology 145(7):0000–0000
Copyright © 2004 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2004-0245

# Expression of Aromatase and Steroidogenic Factor 1 in the Lung of the Urodele Amphibian *Pleurodeles waltl*

SANDRA KUNTZ, DOMINIQUE CHARDARD, AMAND CHESNEL, MARIETTE DUCATEZ, MARTINE CALLIER, AND STEPHANE FLAMENT

*EA 3442 Génétique, Signalisation, Différenciation, Université Henri Poincaré, Nancy I. Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France*

**We report here the results of the analysis of aromatase and steroidogenic factor 1 (Sf1) expression in adult lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Using RT-PCR experiments, we show the expression of the estrogen-synthesizing enzyme, aromatase, in this organ. In the lung, no significant difference between males and females was observed in the level of aromatase mRNAs. Aromatase mRNA levels were also identical to those found in the brain, but the levels were 2-fold lower than in the testis or the ovary. Aromatase activity measurements revealed the presence of an active form of aromatase in the lung, which was similar in males and females. There was no difference in the level of aromatase activity between lung, brain, and testis, but a higher activity was measured in the ovary (13.7-fold compared with testis). Therefore, the differences in aromatase mRNA level between the ovary and the other organs did not mirror the differences in aromatase activity, suggesting the involvement of posttranslational events. Aromatase was also expressed in the lung of the anuran amphibian *Xenopus laevis*. In *Pleurodeles* lung, Sf1 mRNAs was also detected. There was no difference between males and females in the level of these mRNAs. The Sf1 mRNA levels were not significantly different from those measured in the brain, but a significant 2.1-fold higher level of expression was found in the gonads. These results demonstrate clearly the expression of steroidogenic markers in the adult lung of amphibians, but the biological significance of this remains to be determined. (*Endocrinology* 145: 0000–0000, 2004)**

MANY PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS, including metabolism, homeostasis, growth, and reproduction, are under hormonal control or, at least, are influenced by hormones (1). Sex steroids play a key role in reproductive function among all vertebrate species and in sex differentiation of nonmammalian vertebrates. Estrogens are synthesized by a microsomal enzyme complex termed aromatase, which is comprised of aromatase cytochrome P450 and a ubiquitous reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase (2). Aromatase cytochrome P450 is responsible for binding the C19 steroid substrate (androstenedione and testosterone) and catalyzing the rate-limiting reaction in estrogen biosynthesis, which leads to the phenolic A ring typical of estrogens. In most vertebrate species that have been studied, aromatase expression occurs exclusively in the gonads and brain. In adults of humans and other primates, aromatase is also found in the placenta and in adipose tissue. In these mammals, in fetal tissues, the distribution of aromatase is widespread (3–7). Thus, in addition to the endocrine action of estrogens, the local production of estrogens acting in an autocrine or a paracrine way is also important.

One of the known regulators of aromatase expression is steroidogenic factor 1 (Sf1) (8, 9). Sf1 encodes a nuclear orphan receptor belonging to the nuclear receptor superfamily (10). The sequence and function of this gene are highly conserved among many taxa. It is expressed in several tissues involved in steroidogenesis and/or reproduction, including the adrenal gland in mammals and its corresponding organ in other species (*e.g.* interrenal organ in amphibians), the brain, and the gonad (11).

In the context of sex differentiation, we have performed several studies on the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Aromatase activity measurements in the gonads of the larvae revealed a higher level in females than in males (12). We have cloned the $P_{450}$-aromatase gene in that species (GenBank accession no. AY135485) and observed that the differences in aromatase activity might be explained at least in part by differences at the translational level (13). We have recently cloned the Sf1 gene in *P. waltl* (GenBank accession no. AY540336) to determine whether the differences in aromatase expression could be related to differences in Sf1 expression.

During the study of adult tissues, we observed an expression of both aromatase and Sf1 in the lung of *Pleurodeles waltl*. We report here the results of a more detailed analysis of this organ. Our results showing the expression of active $P_{450}$-aromatase and Sf1 in the lung of *Pleurodeles waltl*, as well as aromatase expression in the lung of *Xenopus laevis*, suggest that this organ could have a steroidogenic function in some amphibian species.

## Materials and Methods

### *Animals*

Adults of *P. waltl* and *X. laevis* were reared in fresh water at 20 ± 2 C in our laboratory. Animals were anesthetized in a solution of benzocaine (0.03%), and several organs, such as brain, testis, ovary, heart,

Abbreviations: GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Sf1, steroidogenic factor 1.

*Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (http://www.endo-society.org), the foremost professional society serving the endocrine community.

balt3/zee-end/zee-end/zee00704/zee0291-04a | saylora | S=4 | 4/27/04 | 8:16 | Art: 1158438 | Input-cd



liver, intestine, kidney, spleen, and lung, were dissected and checked for aromatase and Sf1 expression.

### *RT-PCR analyses*

The detailed protocol for reverse transcription has previously been described (13). Total RNA was extracted from 50–100 mg of tissue using 1 ml of TRIzol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and quantified. Total RNA (3 μg) was reverse transcribed using hexamer primers and 100 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 25 μl. A 2-μl aliquot of resultant cDNA was used for PCR. The amplification was performed with 0.1 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 2.5 mM $MgCl_2$, and 0.4 pM of each primer in a total volume of 25 μl.

Specific primers for *P. waltl* $P_{450}$-aromatase (GenBank accession no. AY135485) were 5′-ATTGCAGCACCTGACACGAT-3′ and 5′-TTGTTCTGTACATTCTCTAA-3′ and led to a PCR product of 510 bp in length. For *X. laevis* aromatase, the primers were deduced from the sequence published by Miyashita *et al.* (14); the primers were 5′-CATTTCTTATGGCCGTTT-3′ and 5′-TTGCATAAGTCCTGGACCAGAC-3′ and led to a 300-bp PCR product. The primers for Sf1 were 5′-GGGTACACCTACCCACACTT-3′ and 5′-TCTTGGCCTGTGACCAGGAG-3′. They were deduced from the sequence of *P. waltl* Sf1 cDNA that we recently cloned (GenBank accession no. AY540336). The resulting PCR product was 462 bp in length. All the PCR products encompass two exon/intron boundaries based on other vertebrate aromatase and Sf1 genes.

As a control to ensure that the RNA was not degraded or to prevent poor transcription quality, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used in the case of *P. waltl* (primers: 5′-ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3′ and 5′-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3′, leading to a 290-bp fragment), whereas EF1-α was chosen in the case of *X. laevis* (primers: 5′-CCTGAATCACCCAGGCCAGATTGGTG-3′ and 5′-GAGGGTAGTCTGAGAAGCTCTCCACG-3′, leading to a 222-bp fragment). The PCR conditions were 1 min denaturation at 94 C, 1 min annealing, and 1 min elongation at 72 C. Annealing temperatures were 52 C for *Pleurodeles* aromatase and GAPDH, 60 C for Sf1, and 57 C for *Xenopus* aromatase and EF1-α. We performed 35 cycles for qualitative analyses. For semiquantitative analyses, a 26-cycle amplification was performed because, in that case, the amplification takes place in the linear phase of the PCR reaction.

PCR products (10 μl) were run in a 1% agarose gel and either observed directly or transferred to nylon membrane (Hybond-N; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) before hybridization with digoxigenin-labeled probes and detection by chemiluminescence using standard conditions (13). The intensity of the hybridization signal was measured by using the GelDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and a software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories). The relative amounts of either $P_{450}$-aromatase or Sf1 mRNA were normalized to GAPDH for *Pleurodeles* and to EF1-α for *Xenopus*.

The PCR products were sequenced to verify that they had the expected nucleotide sequences for both aromatase and Sf1 (Genome Express, Paris, France).

### *Aromatase activity measurement*

The activity of the enzyme was determined by the use of the tritiated water method as previously described (12). The radioactivity from tritiated water released by aromatization was measured, and enzymatic activity was calculated and expressed in femtomoles of estrone produced per hour per milligram of tissue.

### *Statistical analysis*

Aromatase activity, aromatase mRNA, and Sf1 mRNA were quantified one time per organ for each animal. The results are expressed as mean ± SE of several measurements performed on different animals as indicated in the text. Data were analyzed by means of ANOVA and Student-Newman-Keuls multiple comparison procedures using the SPSS 11.5 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results and Discussion

Qualitative RT-PCR analyses (Fig. 1) revealed the presence of aromatase mRNA in the lung of adult *Pleurodeles*. The sequence of the PCR product showed 100% identity with the cDNA sequence (data not shown), demonstrating that there was no doubt about the nature of the signal detected. Aromatase expression was also found in gonads and brain, whereas no signal was observed in other organs such as heart, liver, intestine, kidney, or spleen. Semiquantitative measurements (Fig. 1) revealed that the amount of mRNA was not significantly different between males and females in different organs. In the lung, the aromatase to GAPDH mRNA ratio appeared similar to that observed in the brain (males and females grouped: 0.59 ± 0.19 in lung *vs.* 0.6 ± 0.24 in brain) but was significantly lower than the ratio measured in the gonads (males and females grouped: 1.2 ± 0.19; $P < 0.05$). In *P. waltl*, in both sexes, the lung is physically linked to the gonad. Thus, we verified that the presence of aromatase mRNA in this organ was not the result of a gonadal component. A lung was divided into three pieces, posterior, medium, and anterior, and the most posterior and the most anterior ones were devoid of any link with the gonad. Aromatase mRNAs were found in equal amounts in all pieces (data not shown), and this discarded the possibility of a gonadal contaminant.

To determine whether these mRNAs were subjected to

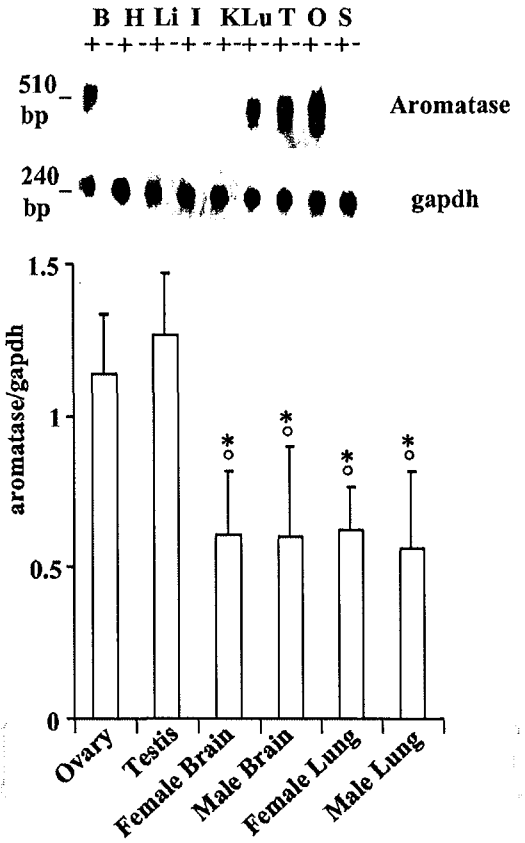



FIG. 1. Aromatase expression in different organs of *P. waltl*. *Top*, Hybridization signal after qualitative RT-PCR. For brain (B), heart (H), liver (Li), intestine (I), kidney (K), lung (Lu), testis (T), ovary (O), and spleen (S), two experiments with (+) or without (−) reverse transcriptase were performed. *Bottom*, The results of semiquantitative analyses (means ± SEs of four replicates; one measure per organ per animal). *, $P < 0.05$ *vs.* ovary and °, $P < 0.05$ *vs.* testis.

balt3/zee-end/zee-end/zee00704/zee0291-04a | saylora | S=4 | 4/27/04 | 8:16 | Art: 1158438 | Input-cd



translation, aromatase activity measurements were performed (Fig. 2). The strongest activity was found in the ovary in which the enzyme was able to aromatize 3.15 ± 1.9 fmol of (1β-$^3$H)androstenedione/h·mg of tissue. The activity in the testis was 13.7-fold lower (0.23 ± 0.08 $10^{-15}$ mol/h·mg of tissue; $P < 0.05$). The enzymatic activity in the lung was not significantly different from that measured in the testis (0.26 ± 0.12 and 0.23 ± 0.08 fmol of (1β-$^3$H)androstenedione/h·mg of tissue in female and male lungs, respectively). These activities were not significantly different from those of female or male brain.

It is interesting to note that the level of aromatase mRNAs is not correlated to the level of activity of the enzyme. Thus, a similar level of transcription seems to exist in testis and ovary, whereas the activity is 13-fold higher in the ovary. This indicates that posttranscriptional modifications are involved and that they are important for the final status of aromatase activity. This might be the result of a different concentration of the protein in the organs, although studies of the hypothalamus of the female frog *Rana esculenta* revealed changes in aromatase activity throughout the reproductive cycle without changes in aromatase concentration (15). Posttranslational modifications, such as phosphorylation, could also be involved because kinase activators or kinase inhibitors are able to induce fast changes in cerebral aromatase activity in birds (16).

To our knowledge, the presence of aromatase in vertebrate lung has only been found previously in the case of human and monkey fetuses. This was observed by enzyme activity measurements (3, 4) as well as by RT-PCR amplification (5, 6) and more recently by real-time RT-PCR (7). In these experiments, no sex differences in aromatase levels were evident in the lung that could be in accordance with our results. Nevertheless, a widespread distribution was observed and the level of aromatase expression or activity in fetal lung was very low. Our results on adult *P. waltl* are different because we did not observe a ubiquitous distribution (no expression was observed in heart, liver, intestine, kidney, or spleen). Moreover, the level of aromatase expression or activity in the lung was as high as in the testis where aromatase is supposed to play a physiological role as in mammals (17).

Because the presence of active aromatase was demonstrated in *Pleurodeles* lung, we studied the expression of Sf1. Indeed, the product of this gene is known to be a regulator of aromatase expression (8, 9). The primers that we designed allowed us to amplify a cDNA fragment of 462 bp in ovary, testis, kidney, brain, spleen, and lung (Fig. 3). No expression was observed in heart, liver, and intestine. The sequence of the PCR product obtained from lung mRNAs showed 100% identity with the cDNA sequence (data not shown), demonstrating that there could be no doubt about the nature of the signal detected. Semiquantitative RT-PCR analyses revealed no significant difference between male and female Sf1 levels in all of the organs. There were no significant differences in the ratio of Sf1 to GAPDH between the brain and the lungs. A significant 2.1-fold higher ratio was found in the gonads compared with lungs (males and females grouped: 1.03 ± 0.29 *vs.* 0.49 ± 0.14).

So, Sf1 was expressed in *Pleurodeles* lung. The expression of Sf1 in an organ is not always associated with a steroidogenic function for this organ. For instance, in *Pleurodeles*, we have found Sf1 expression in the spleen, which is not known as a steroidogenic organ. However, in *Pleurodeles* lung, the expression of Sf1 was also accompanied by the expression of aromatase, and this could indicate a steroidogenic function.

To determine whether our findings about the lung of *P. waltl* might reflect a feature common to other amphibians, we studied aromatase expression in the anuran *X. laevis*, whose $P_{450}$-aromatase gene has already been cloned (14). A study of adult organs in that species has been performed previously, but it did not include the lung (14). Our RT-PCR analysis revealed aromatase expression in *X. laevis* lung too (Fig. 4). The PCR product had the expected sequence (data not shown). It is interesting to note that, in that species, there is no connection between the lung and the gonad. To our knowledge, in other amphibian species, no study of aromatase expression has been performed in adult tissues.

In *Rana rugosa*, Northern blot analysis of Sf1 revealed only

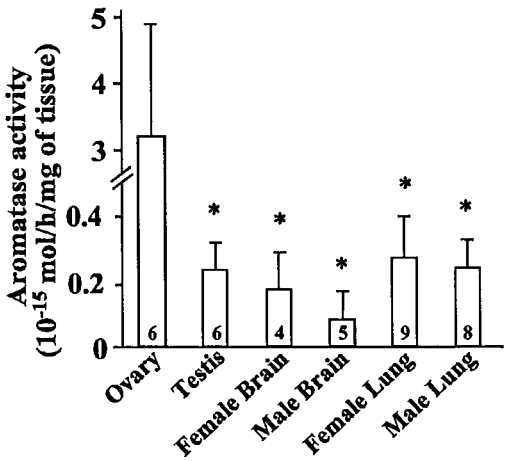



FIG. 2. Aromatase activity in several organs of *P. waltl*. Ovaries, testes, brains, and lungs were submitted to aromatase activity measurement by the tritiated water method. Values are means ± SEs of several replicates (one measure per organ per animal) whose number is indicated (*, $P < 0.05$ *vs.* ovary).

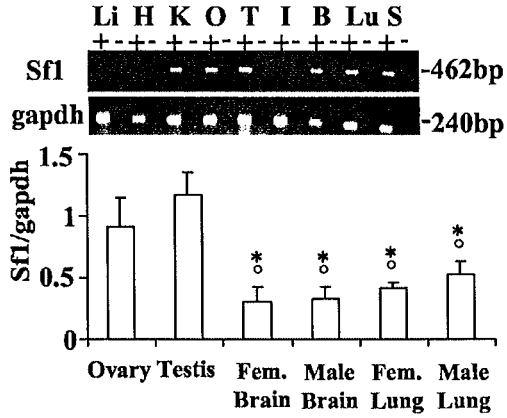



FIG. 3. Sf1 expression in different organs of *P. waltl*. *Top*, Typical result of a qualitative RT-PCR after ethidium bromide staining. *Bottom*, Results of semiquantitative analyses (means ± SEs of four replicates; one measure per organ per animal). *, $P < 0.05$ *vs.* ovary and °, $P < 0.05$ *vs.* testis.

balt3/zee-end/zee-end/zee00704/zee0291-04a | saylora | S=4 | 4/27/04 | 8:16 | Art: 1158438 | Input-cd



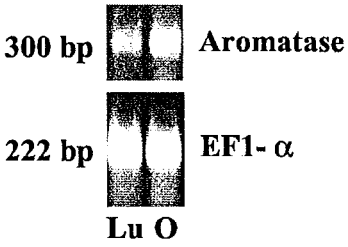



FIG. 4. Aromatase expression in the lung and ovary of *X. laevis*. The PCR products were run on an agarose gel and stained with ethidium bromide. EF1-α was used as a control.

a faint band in testis samples, whereas RT-PCR revealed a wider distribution (testis, brain, spleen, and adrenal/kidney) (18). No expression was found in the lung, and surprisingly, no expression was detected in the ovary, which is in contrast to what is observed in other vertebrate species. In *Rana catesbeiana*, Sf1 was studied at the protein level using an immunserum raised against the mouse antigen (19). In the adult frog, the protein was found in different tissues including gonads, brain, interrenal, liver, and intestine, but unfortunately, the search for the protein in the lung does not seem to have been performed.

What could be the reason for such an expression of steroidogenic markers, especially aromatase, in the lung of *P. waltl* and *X. laevis*? One might expect that the local production of estrogens could regulate some aspects of lung physiology. Several roles for estrogens in the lung have been illustrated in mammals. For instance, estrogens, via their receptors α and β, seem to be involved in the proliferation of lung-derived cell lines, suggesting a potential role in normal and malignant proliferation processes (20, 21). In addition, in rats, 17β-estradiol attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension by decreasing pulmonary expression of the vasoactive and mitogenic peptide endothelin-1 (22). Nevertheless, our knowledge of amphibian lung physiology is very poor, and further studies are required to determine the exact role for aromatase and Sf1 expressions in this organ.

## Acknowledgments

We thank Dr. J. Magdalou and M-H Piet for their help in radioactivity measurements, Dr. H. Schroeder for statistical analysis, and Drs. C. Rickman and F. Kuepper for reading the manuscript. We also thank Jean-Charles Olry and Alain Iurétig for rearing the animals and Christiane Tankosic for her technical support.

Received February 25, 2004. Accepted April 1, 2004.

Address all correspondence and requests for reprints to: Pr. S. Flament, Université Henri Poincaré-Nancy I. Faculté des Sciences, EA3442, Entrée 1B, 9ème étage, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail: stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr.

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 des Vosges, and of the Association pour la Recherche sur le Cancer, and of the Conseil Régional de Lorraine. S.K. is a recipient of a grant from the French "Ministère de la Recherche."

## References

1. **Schmidt-Nielsen K** 1997 Animal physiology. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press
2. **Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD et al** 1994 Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev 15:342–355
3. **Doody KJ, Carr BR** 1989 Aromatase in human fetal tissues. Am J Obstet Gynecol 161:1694–1697
4. **Sholl SA, Goy RW, Kim KL** 1989 5 α-reductase, aromatase, and androgen receptor levels in the monkey brain during fetal development. Endocrinology 124:627–634
5. **Price T, Aitken J, Simpson ER** 1992 Relative expression of aromatase cytochrome P450 in human fetal tissues as determined by competitive polymerase chain reaction amplification. J Clin Endocrinol Metab 74:879–883
6. **Toda K, Simpson ER, Mendelson CR, Shizuta Y, Kilgore MW** 1994 Expression of the gene encoding aromatase cytochrome P450 (CYP19) in fetal tissues. Mol Endocrinol 8:210–217
7. **Pezzi V, Mathis JM, Rainey WE, Carr BR** 2003 Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. J Steroid Biochem Mol Biol 87:181–189
8. **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
9. **Carlone DL, Richards JS** 1997 Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3′,5′-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. Mol Endocrinol 11:292–304
10. **Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR** 1999 Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. J Cell Biochem 32–33(Suppl):110–122
11. **Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A** 2003 SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. Nucl Recept 1:8–31
12. **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
13. **Kuntz S, Chesnel A, Duterque-Coquillaud M, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Dournon C, Flament S, Chardard D** 2003 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
14. **Miyashita K, Shimizu N, Osanai S, Miyata S** 2000 Sequence analysis and expression of the P450 aromatase and estrogen receptor genes in the *Xenopus* ovary. J Steroid Biochem Mol Biol 75:101–107
15. **Guerriero G, Roselli CE, Paolucci M, Botte V, Ciarcia G** 2000 Estrogen receptors and aromatase activity in the hypothalamus of the female frog, *Rana esculenta*. Fluctuations throughout the reproductive cycle. Brain Res 880:92–101
16. **Balthazart J, Baillien M, Ball GF** 2001 Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. J Steroid Biochem Mol Biol 79:261–277
17. **Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S** 2003 Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. Reprod Biol Endocrinol 1:35–40
18. **Kawano K, Miura I, Morohashi K, Takase M, Nakamura M** 1998 Molecular cloning and expression of the SF-1/Ad4BP gene in the frog, *Rana rugosa*. Gene 222:169–176
19. **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
20. **Mollerup S, Jorgensen K, Berge G, Haugen A** 2002 Expression of estrogen receptors α and β in human lung tissue and cell lines. Lung Cancer 37:153–159
21. **Zang EA, Wynder EL** 1996 Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. J Natl Cancer Inst 88:183–192
22. **Earley S, Resta TC** 2002 Estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 gene expression. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283:86–93

# II. Etude de différents gènes susceptibles d'être impliqués dans la différenciation sexuelle

## 1) Rôle de Sf1 dans la différenciation gonadique chez Pleurodeles waltl

( article soumis pour publication)

### A) Introduction

SF1 est un facteur de transcription qui, chez les vertébrés, joue un rôle important dans la mise en place de la gonade ainsi qu'au cours de sa différenciation. En effet, les transcrits Sf1 sont détectés très tôt dans les crêtes génitales mâles et femelles chez de nombreuses espèces (Ikeda Y. *et al.*, 1994; Hatano O. *et al.*, 1994; Hanley N.A. *et al.*, 1999; Pilon N. *et al.*, 1998; Smith C.A. *et al.*, 1999a; Kawano K. *et al.*, 1998). Ensuite, l'expression de Sf1 augmente soit dans le testicule, soit dans l'ovaire selon les espèces. Ainsi, il est impliqué dans la différenciation testiculaire chez les mammifères (Ikeda Y. *et al.*, 1994; Hatano O. *et al.*, 1994; Hanley N.A. *et al.*, 1999; Pilon N. *et al.*, 1998) et la tortue *Trachemys scripta* (Fleming A. *et al.*, 1999) tandis qu'il intervient dans la différenciation ovarienne chez le poulet (Smith C.A. *et al.*, 1999a), la grenouille *Rana catesbeiana* (Mayer L.P. *et al.*, 2002) et l'alligator (Western P.S. *et al.*, 2000). Chez *Pleurodeles waltl*, nous avons entrepris une étude de ce gène afin de définir s'il joue aussi un rôle au cours de la différenciation gonadique. De plus, lors de cette analyse, nous avons tenté de faire un lien avec l'aromatase, enzyme régulée par SF1 chez les mammifères (Lynch J.P. *et al.*, 1993; Michael M.D. *et al.*, 1995). Chez notre modèle, l'aromatase est sensible à la température : l'élevage de larves ZW à 32°C pendant toute la période thermosensible induit une diminution de l'activité et de l'expression de l'aromatase (Chardard *et al.*, 1995) (voir partie résultats I.1). Afin de mettre en évidence une éventuelle régulation de l'aromatase par SF1, nous avons étudié l'effet de la température sur l'expression de Sf1 au cours de la période thermosensible. Un autre site de réponse à la température, le cerveau, a été décrit chez deux espèces de tortue TSD (Jeyasuria P. et Place A.R., 1997; Willingham E. *et al.*, 2000; Crews D. *et al.*, 2001). Il est supposé être un relais dans le processus de la détermination sexuelle, susceptible d'influencer la différenciation gonadique. Précédemment, nous avons démontré que la température ne modifiait pas le niveau de transcrits aromatase dans le cerveau des larves. Toutefois, une action sur un autre facteur comme Sf1 n'était pas exclue et a fait l'objet de la dernière partie de l'étude.

B) Principaux résultats

L'ADNc Sf1 du pleurodèle a été isolé à partir d'ARNs totaux d'un testicule adulte. La séquence en acides aminés déduite présente un fort pourcentage d'identité avec celles de la tortue *Trachemys scripta* (81%), de la grenouille *Rana rugosa* (79%), de la souris (63%) et de l'homme (63%).

Les études d'expression ont été menées dans les gonades en développement. Les complexes gonades-mésonephros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés à différents stades de la période thermosensible (42 à 54) et au stade 55. Afin de diminuer la variabilité inter-individus, nous avons réalisé des «pools» de 5 complexes gonades-mésonéphros pour chaque échantillon. Ils ont ensuite été analysés par RT-PCR qualitative (35 cycles). Nous avons détecté un signal dès le stade 42 chez les trois types de larves. Cette expression est ensuite maintenue quels que soient le stade et le sexe.

Une analyse par RT-PCR semi-quantitative (26 cycles) a ensuite été réalisée aux stades 54 et 55 (Fig.27A). Comme précédemment, des échantillons de 5 complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été réalisés. Nous n'avons observé aucune différence significative dans le niveau de transcrits Sf1 au stade 54. Cependant, au stade 55, nous avons détecté une augmentation significative du ratio Sf1 / Gapdh dans les complexes gonades-mésonéphros des larves $ZW^{20}$ par rapport aux larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{32}$. Des résultats similaires ont été obtenus sur des gonades seules prélevées au stade 55. Donc, comme pour l'aromatase, le niveau de transcrits Sf1 augmente au cours de la différenciation ovarienne.

Néanmoins, les changements concernant Sf1 surviennent après ceux de l'aromatase (stade 54 pour les ARNm). En ce qui concerne l'influence de la température, l'expression de Sf1 n'est pas modifiée avant le stade 55 chez les larves $ZW^{32}$. Ici encore, les changements d'expression de Sf1 surviennent après ceux de l'aromatase.

Les études d'expression ont aussi été réalisées sur des cerveaux de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ à différents stades de la période thermosensible (42, 44, 46, 48, 50, 52, 54) et au stade 55. Comme pour les complexes gonades-mésonéphros, des «pools» de 4 cerveaux ont été réalisés afin de diminuer l'hétérogénéité due à la variabilité individuelle. Les échantillons ont ensuite été analysés par RT-PCR qualitative (35 cycles). Nous avons détecté un signal dès le stade 42 chez les trois types de larves. Cette expression est ensuite maintenue quels que soient le stade et le sexe.

L'analyse semi-quantitative (28 cycles) a ensuite été réalisée aux stades 54 et 55 sur

des échantillons de 4 cerveaux de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ (Fig.27B). Les ratios Sf1/Gapdh ne présentent aucune différence significative quels que soient le stade étudié ou le type de larves analysé. Ces résultats sont similaires à ceux observés pour l'aromatase.

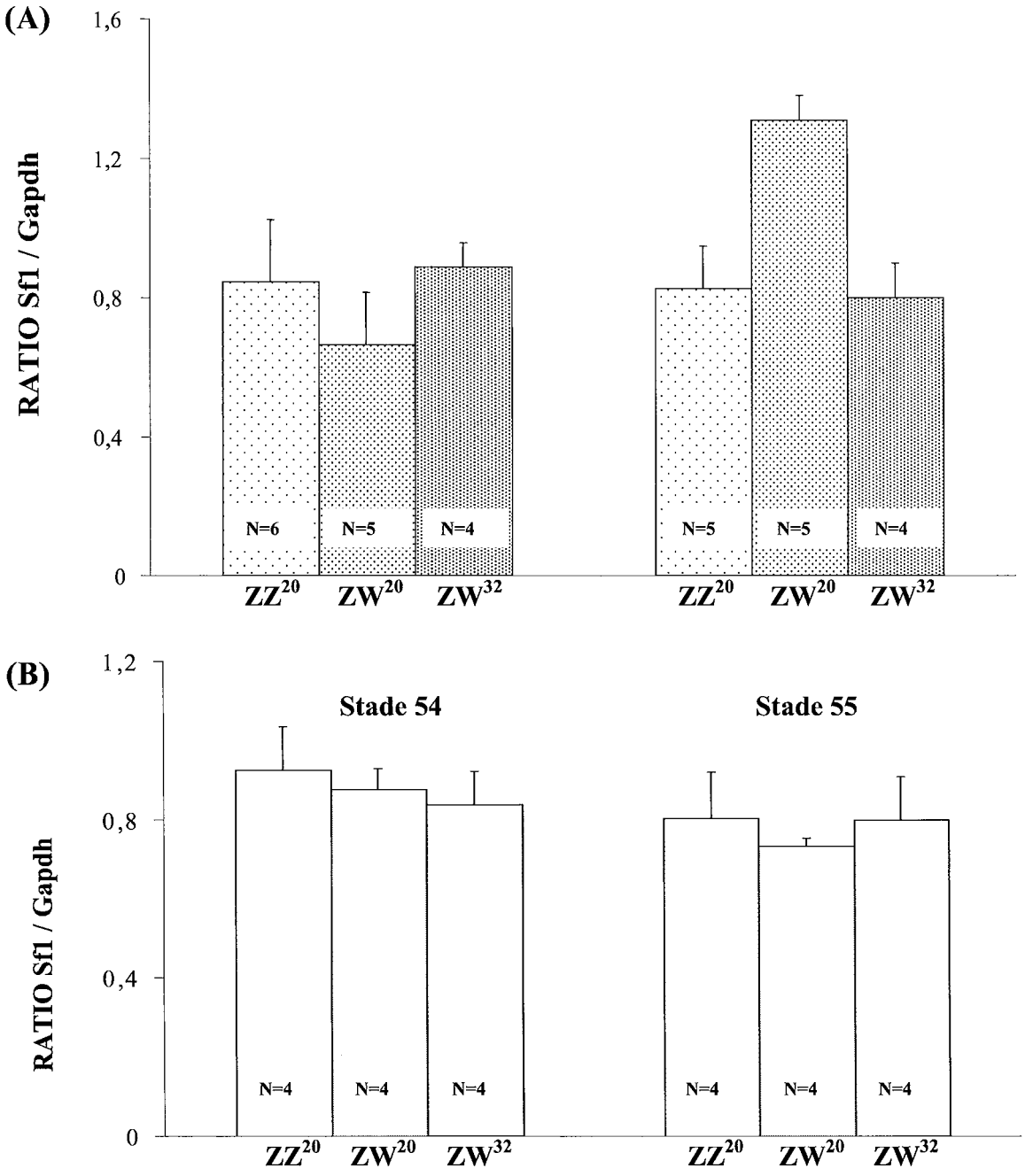



**Figure 27 : Expression de Sf1 dans les gonades (A) et les cerveaux (B) des larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$.** (A) Les ARNs totaux de cinq complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ aux stades 54 et 55 ont été extraits, rétrotranscrits puis amplifiés par PCR semi-quantitative (26 cycles). Après hybridation, l'intensité du signal Sf1 a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. Le nombre de répétitions est indiqué par N. *, $P<0,05$ *vs.* $ZW^{20}$. (B) Les ARNs totaux de quatre cerveaux de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ aux stades 54 et 55 ont été analysés par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles). La moyenne des rapports est représentée par l'histogramme. Le nombre de répétitions est indiqué par N.

C) Conclusion

Nous avons isolé un ADNc Sf1 chez le pleurodèle et la protéine déduite présente une haute identité avec celles d'autres espèces de vertébrés. Sf1 est exprimé très tôt, dès le stade 42, correspondant à la gonade indifférenciée, chez les larves $ZZ^{20}$et $ZW^{20}$. L'expression de Sf1 est ensuite, comme celle de l'aromatase, corrélée avec la différenciation ovarienne : elle devient significativement plus importante chez les larves $ZW^{20}$ que chez les larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{32}$ au stade 55 que l'analyse soit réalisée sur les complexes gonades-mésonéphros ou sur les gonades seules.

La régulation de l'aromatase par Sf1 pourrait avoir lieu au cours de la période thermosensible puisque le messager Sf1 est présent très tôt, avant l'aromatase qui n'est détectée qu'à partir du stade 44. Cependant, l'expression sexuelle dimorphique de Sf1 n'est détectée qu'au stade 55. Ceci pourrait être dû à la présence du mésonéphros dans nos échantillons, les gonades n'étant dissociables qu'à partir du stade 55. Ces résultats restent donc à confirmer par l'utilisation d'autres techniques d'étude de l'expression génique comme l'hybridation *in situ* par exemple.

Si les résultats obtenus au stade 54 sur l'ensemble gonades-mésonéphros reflètent bien la réalité, alors Sf1 ne serait pas une cible directe de la température dans le contrôle de la différenciation sexuelle puisqu'aucune différence n'est détectée pendant la période thermosensible. La diminution de l'expression de Sf1 au stade 55 chez les larves $ZW^{32}$ serait ainsi la conséquence de la différenciation testiculaire et de la baisse de synthèse d'œstrogènes sous l'effet du traitement thermique. La régulation de l'expression du gène Sf1 par les œstrogènes a déjà été démontrée chez la tortue *Trachemys scripta* (Fleming A. et Crews D., 2001). Cette étude est en cours chez notre modèle.

Enfin, les résultats suggèrent fortement que le cerveau n'intervient pas comme relais dans la détermination sexuelle puisque ni Sf1, ni l'aromatase ne présentent une expression sexe-spécifique dans cet organe.

# *Article 5.

**Developmental Dynamics**

**Submitted April 8, 2004.**

# Expression of steroidogenic factor 1 during gonadal differentiation in the amphibian *Pleurodeles waltl*

SANDRA KUNTZ, DOMINIQUE CHARDARD, MARIETTE DUCATEZ, MARTINE CALLIER, STEPHANE FLAMENT AND AMAND CHESNEL.

EA 3442 : Génétique, Signalisation, Différenciation. Faculté des Sciences. Université Henri Poincaré - Nancy 1. Boulevard des Aiguillettes. 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy CEDEX. France.

**Corresponding author** :

Pr. Stéphane Flament

Université Henri Poincaré-Nancy 1. Faculté des Sciences. EA3442.

Boulevard des Aiguillettes. BP 239.

54506 Vandoeuvre-lès-Nancy CEDEX. France.

Phone number: 33 (0)3-83-68-42-52

Fax number: 33 (0)3-83-90-32-77

E-mail : Stephane.Flament@scbiol.uhp-nancy.fr

**Running Title:**

*Sf1* in *Pleurodeles* gonadal differentiation

**Key words**

*Pleurodeles*, gonadal sex differentiation, sex reversal, steroidogenic factor 1.

**Grant Sponsor :**

These studies were 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 « Conseil Régional de Lorraine » and the University Henri Poncaré (BQR). S.K is a recipient of a grant from the french "Ministère de la Recherche".

**Abstract**

Whether steroidogenic factor 1 (*Sf1*) could be involved in *Pleurodeles* sex differentiation or temperature dependent sex reversal is the question we have investigated by cloning a *Pleurodeles* Sf1 cDNA and examining its expression. The 486AA putative deduced protein is very conserved when compared to other species. Independently of heat-treatment, Sf1 mRNA is detected in both the ZZ and ZW developing gonad until the end of the thermosensitive period while a ZW female-specific increase in Sf1 expression occurs after the onset of the ovarian-specific aromatase overexpression, suggesting an estradiol-dependent up-regulation of *Sf1* expression. Such an increase does not occur in larval brain where Sf1 mRNA is shown to be present in a sex and temperature independent manner. These results suggest a role for *Sf1* in *Pleurodeles* ovarian differentiation.

**Introduction**

The steroidogenic factor 1 gene (*Sf1*), a vertebrate relative of the Drosophila fushi-tarazu factor-1 (Lala et al, 1992; Morohashi et al, 1992), encodes a nuclear orphan receptor belonging to the nuclear receptor superfamily (Whitfield et al, 1999). In a variety of species, *Sf1* is known to be expressed in several tissues involved in steroidogenesis and/or reproduction such as adrenal in mammals and corresponding organ in other species (e.g. interrenal organ in amphibians), as well as brain and gonad (Val et al, 2003). Steroidogenic factor 1 plays a key role in the development of both the hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes (Ikeda et al, 1993) since homozygous mice with a disruption of *Sf1* have complete adrenal and gonadal agenesis and also show a 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 *Sf1* gene (Achermann et al, 1999). Furthermore, the $Sf1^{(-/-)}$ XY mice have a female phenotype (Luo et al, 1994).

These results are in agreement with an early expression of *Sf1* in the genital ridges of both sexes throughout undifferentiated stage (Ikeda et al, 1994). At a later stage of development, as histological sex differentiation of the gonad begins, several vertebrate species exhibit a sexually dimorphic gonadal expression of *Sf1* in their developing gonads. A higher level of *Sf1* mRNA is found in the male developing gonad in mouse (Ikeda et al, 1994), rat (Hatano et al, 1994), human (Hanley et al, 1999), 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, the protein SF1 controls the expression of many enzymes required for steroid hormone production including aromatase (Parker and Schimmer, 2002). For instance, in rat and human SF1 binds to the *aromatase* promoter and activates its transcription (Lynch et al, 1993; Michael et al, 1995). SF1 binding sites have also been identified in the promoter region of aromatase gene in chicken, medaka and tilapia (Kudo et al, 1996; Tanaka et al, 1995; Yoshiura et al, 2003). Alternatively, estrogen could control *Sf1* as suggested in the red eared slider turtle model (Fleming and Crews, 2001) where an estradiol treatment was shown to produce an *Sf1* up-regulation, although it was not proved that the effect was direct or indirect .

In the amphibian *Pleurodeles waltl*, steroid hormones play a role in sex differentiation since the application of estradiol in the rearing water (at 20°C) 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 and Dournon, 1999) demonstrating that the aromatase enzymatic complex thus plays a very important part in the process of female differentiation (Kuntz et al, 2003a). Aromatase activity measurements in gonad indeed revealed an 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 when compared to ZZ (Kuntz et al, 2003b), suggesting the involvement of an unknown post-transcriptional regulation (Chardard et al, 1995).

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

Since the *aromatase* gene is differentially expressed during the sexual differentiation and considering that this expression can be affected by temperature, we focused our attention on *Sf1*, a known potential regulator of *aromatase*. We have isolated a *Sf1* cDNA containing a putative open reading frame (ORF) and we have performed RT-PCR analyses during larval development. Our results reveal that *Sf1* is expressed early in the undifferentiated gonad of both ZZ and ZW larvae and that later, at stage 55, a ZW specific up-regulation of *Sf1* expression occurs in the differentiating ovary. This high *Sf1* expression is not observed in the gonad of heat treated ZW larvae at the same stage. It seems that aromatase and *Sf1* expressions are closely related, however, since the changes in *Sf1* mRNA level always appear after those affecting aromatase, we propose that in *Pleurodeles waltl*, estrogens could regulate *Sf1* expression. Moreover, the analyses of *Sf1* expression in *Pleurodeles* brain reveal no dimorphic and no temperature-sensitive expression pattern, suggesting that the brain does not play an important role in gonadal differentiation in that species, at least in regard to *Sf1* gene.

## Results

### *Sf1* is conserved in *Pleurodeles waltl* species

*Pleurodeles Sf1* cDNA (Fig 1) was isolated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from total RNA extracted from adult testis. Two independent clones of 657 bp and 800 bp were obtained by degenerated PCR using different set of primers. Then, 5' and 3' RACE were performed in order to isolate the full length *Sf1* mRNA. Two clones of 900 bp and of 1.2 kb were obtained in 5'-end and 3'-end respectively. *Pleurodeles Sf1* cDNA contains a putative 1407 bp open reading frame (Fig 1). It includes a 127 bp 5' UTR and a 582 bp 3' UTR with poly(A) tail. The deduced amino acid sequence of *Pleurodeles waltl* SF1 was compared with SF1 sequences from several species : the frog *Rana rugosa*, the turtle *Trachemys scripta*, chicken, mouse and human (Fig 2). The putative *Pleurodeles* SF1 is composed of 468 amino acids and is related to that of *Rana rugosa* but is slightly longer than that of *Trachemys scripta* (466 residues), mouse (462 residues) and human (461 residues) (Fig 2). Overall sequence identity with *Trachemys scripta* was 81%, *Rana rugosa* 79% and mouse and human 63% (Fig.2).

The SF1 conserved regions were identified by comparison with the corresponding regions in other species : the first and second zinc finger corresponding to DNA binding domain (residues 13 to 78), the Ad4BP/SF1 box (residues 79 to 106), the Region II (residues 274 to 315), the Region III (residues 364 to 387) and the AF-2 domain (residues 458 to 463). The identity rate of each functional domain in SF1 was also examined. In contrast to the second zinc finger, the first one is highly conserved between species, except for *Pleurodeles waltl* which exhibit a single 15-valine-to-Alanine aminoacid substitution. Neverthless, the Pbox ESCKG present in the first zinc finger is conserved in our model. SF1 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 ligand transcriptional activation, is entirely conserved among species. A proline stretch of 7-8 consecutive amino acids is present in the mammalian SF1 but absent in the cases of chicken, turtle, frog and pleurodele.

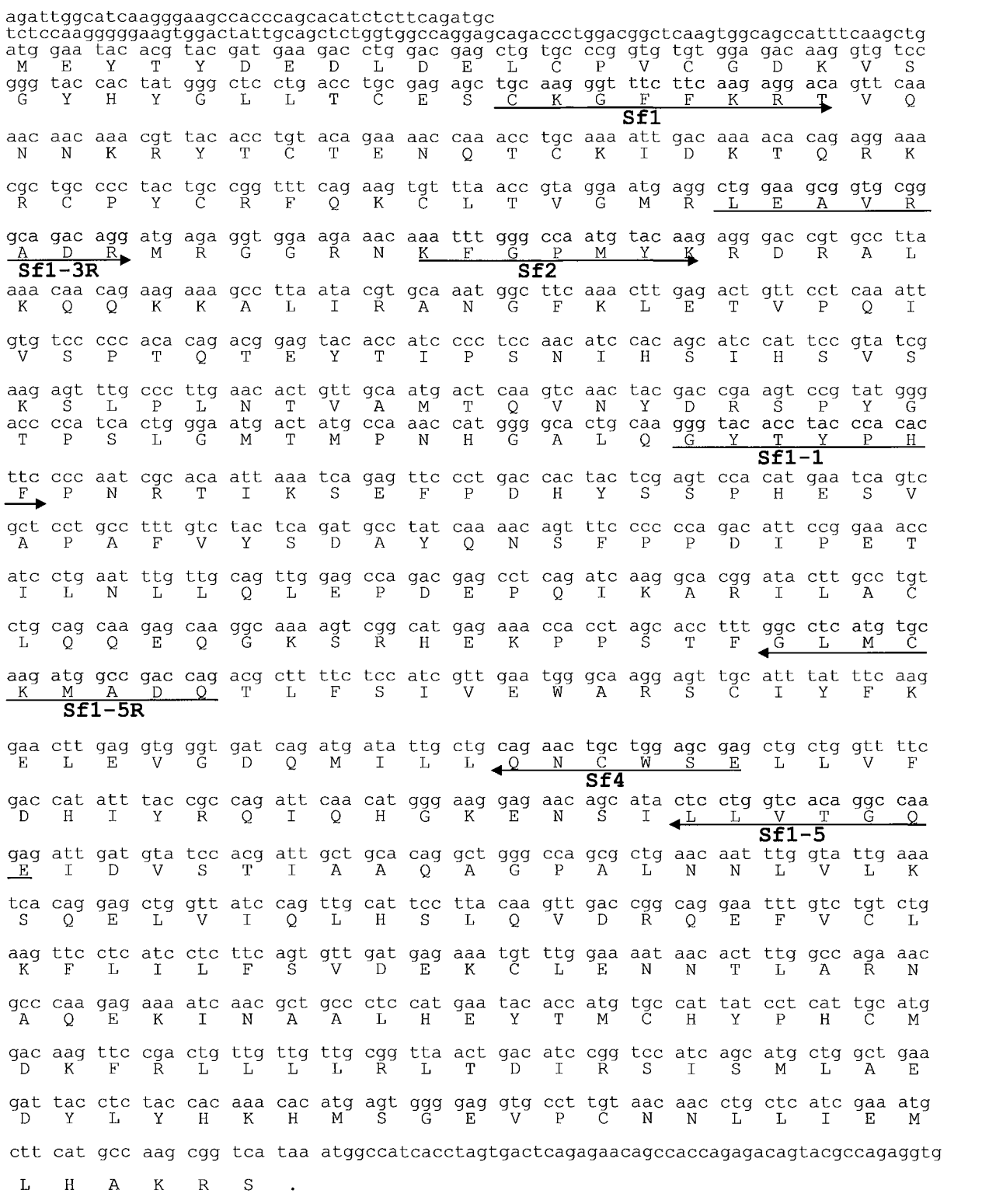



**FIG. 1.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Pleurodeles waltl Sf1* cDNA. (accession number AY540336). *Sf1* cDNA includes a 1407 bp open reading frame, a 127 bp 5' UTR and a 582 bp 3' UTR with a poly (A) tract. The arrows identify the orientation of the gene-specific primers used for different PCR.

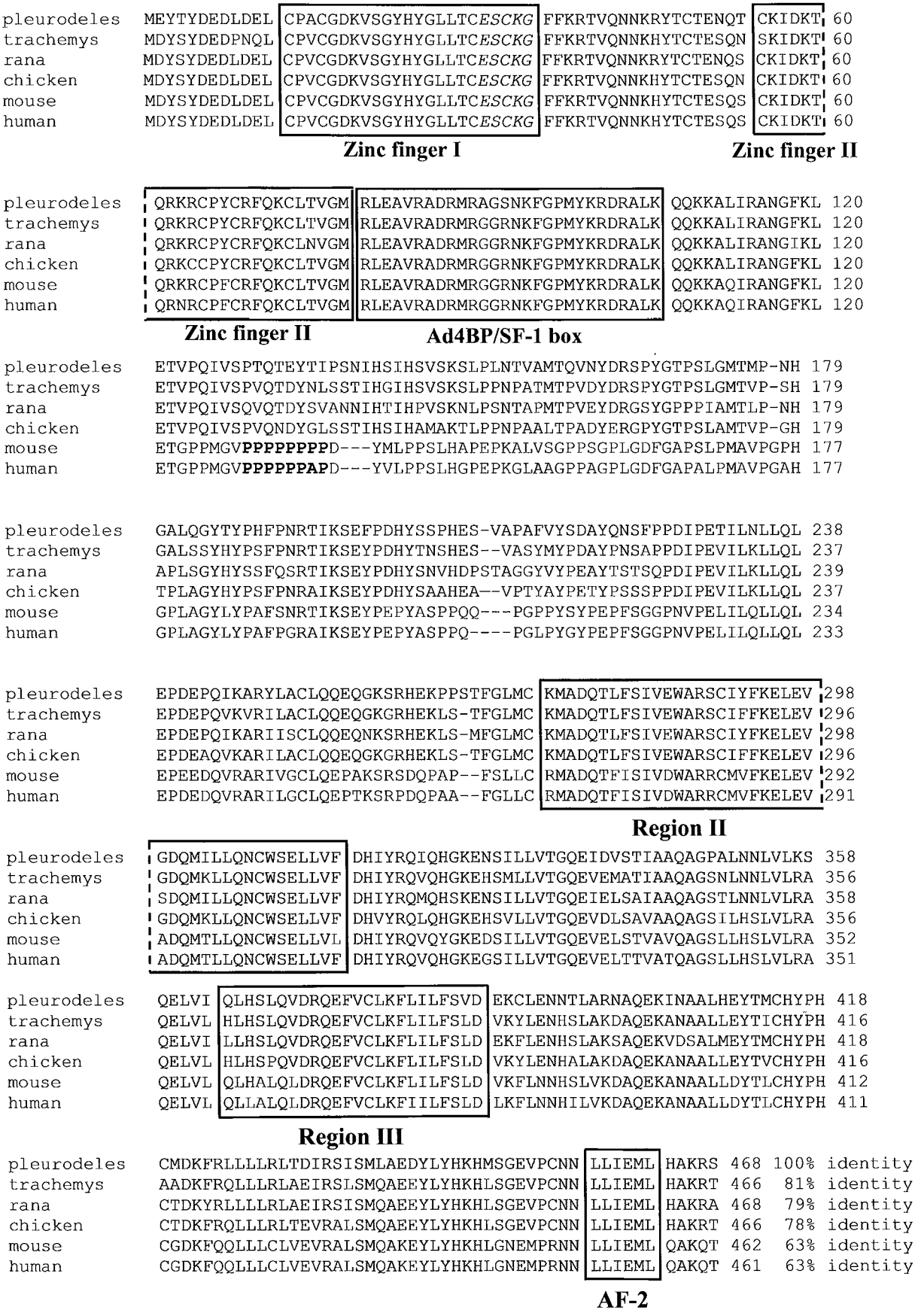



**FIG. 2.** Alignment of the amino acid sequences of *Sf1* cDNAs from several vertebrates species. Amino acid identity with *Pleurodeles* sequence is emphasized in grey. The conserved regions : Zinc finger I, Zinc finger II, SF1 box, Region II, Region III and AF-2 are framed. The proline stretch in mammals is in bold type.

### *Sf1* is expressed early during gonadal development

The *Sf1* mRNA expression pattern in the urogenital system of *Pleurodeles* larvae during the TSP was examined. Qualitative RT-PCR analysis in gonad-mesonephros complexes from $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae taken at different stages of their development showed that *Sf1* is expressed early in the undifferentiated gonad and that the expression is maintained after the histological differentiation which actually starts at stage 53. Indeed, *Sf1* mRNAs are detected in a sex-independent manner since stage 42 and maintained thereafter through the whole TSP that ends at stage 54 (Fig 3). Moreover, temperature appeared to have no silencing effect on *Sf1* during this period of development.

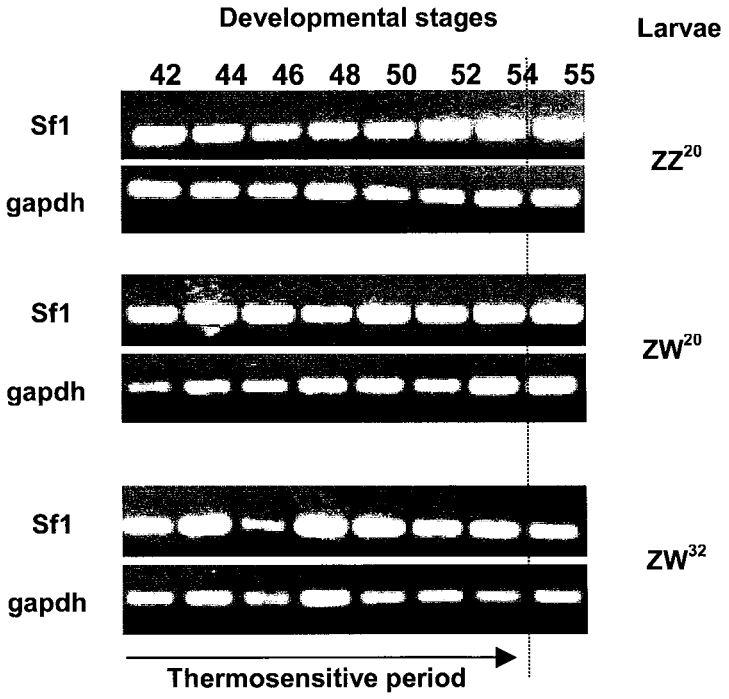



**FIG. 3.** Qualitative analysis of *Sf1* mRNA expression in *Pleurodeles* gonads-mesonephros.
ZZ and ZW larvae raised at 20°C ($ZZ^{20}$ and $ZW^{20}$) and ZW larvae exposed at a temperature of 32°C during all the TSP ($ZW^{32}$) were taken at different stages of TSP (42 to 54) and at stage 55. Total RNA was extracted from pooled gonads-mesonephros complexes isolated from five larvae, reverse transcribed and amplified by PCR for 35 cycles. *gapdh* serves as a positive control.

### *Sf1* expression increases during ovarian differentiation

First, semi-quantitative RT-PCR analyses were performed from total RNA isolated from gonads plus mesonephros of larvae at stage 54, i.e. at the end of the TSP. We never detected significant differences in *Sf1* mRNA levels between $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae (Fig 4). We also studied *Sf1* expression in mesonephros + gonads of larvae at stage 55 in which gonads are more

differentiated and display high differences in their level of aromatase expression (Chardard et al., 1995). At this stage, the level of *Sf1* mRNA is significantly higher in $ZW^{20}$ larvae than in $ZZ^{20}$ (1.58 fold ; P=0.0055) and $ZW^{32}$ larvae (1.63 fold ; P=0.0019). In $ZW^{32}$, the level of *Sf1* transcripts is reduced down to a level which is not significantly different from those observed in control $ZZ^{20}$ larvae (Fig 4).

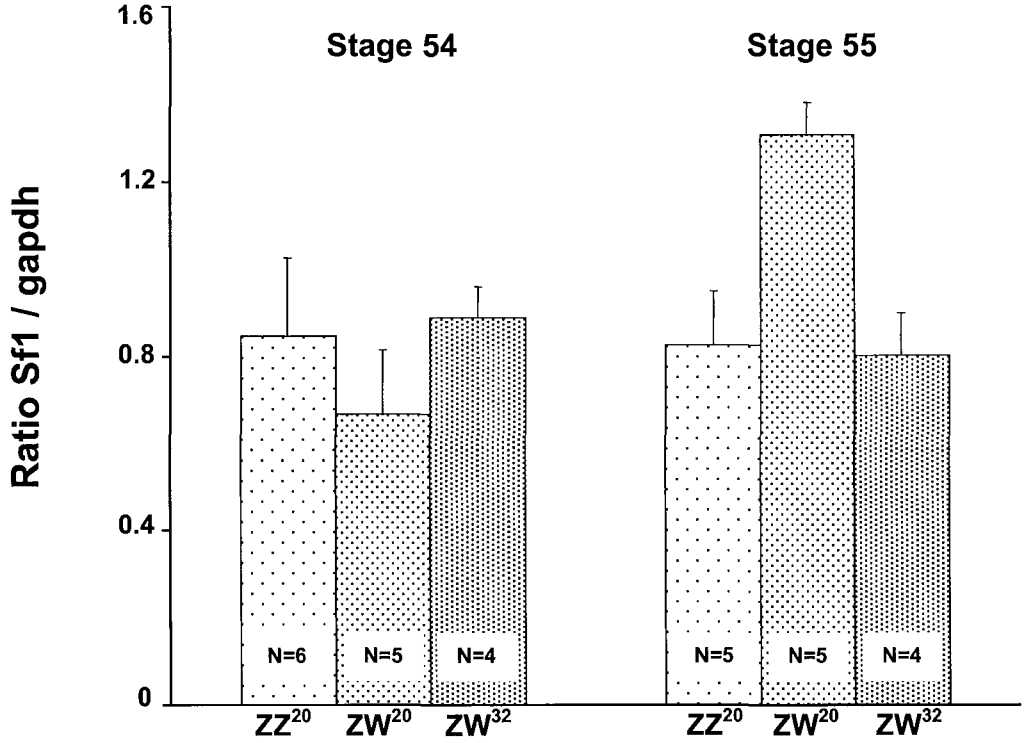



**FIG. 4.** Semi-quantitative analysis of *Sf1* mRNA expression in gonads-mesonephros complexes of $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae at stages 54 and 55. Total RNA of gonads-mesonephros complexes isolated from a pool of five larvae was reversed transcribed and amplified by PCR for 26 cycles. After hybridization, relative amounts of *Sf1* mRNA were normalized to *gapdh*. Values are means of replicates: the number of pools is indicated by N. Vertical bars indicate the mean standard error.

This result was confirmed by an assay performed with isolated gonads at stage 55 (Fig 5). In $ZW^{20}$ larvae, *Sf1* mRNA level is 1.55 fold higher than in $ZZ^{20}$ larvae (P=0.02). A significant difference is also found between $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae, the latter showing a *Sf1*/gapdh mRNA ratio 4 fold lower than $ZW^{20}$ larvae (P=0.0003). There is no significant difference between $ZZ^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae (P=0.075).

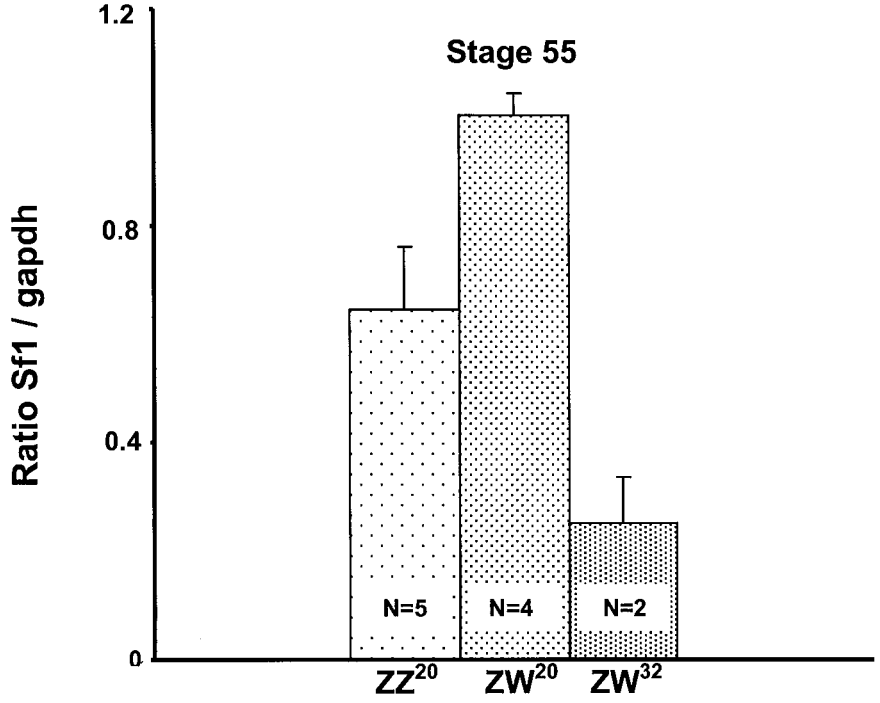



**FIG. 5.** Semi-quantitative analysis of Sf1 mRNA expression in gonads of $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae at stage 55. The same procedures as in figure 4 were used except for pools that were composed of 5 pairs of gonads without mesonephros.

### *Sf1* expression in the brain is neither sexually dimorphic nor temperature-sensitive

The importance of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in vertebrate development brought us to search for *Sf1* expression in the CNS as it was recently performed for aromatase (unpublished data). A qualitative RT-PCR was performed on brain of $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ taken from stage 42 to stage 55 of development. *Sf1* transcripts are detected as soon as stage 42 in the three types of larvae (Fig 6) and *Sf1* expression is maintained until stage 55 which was the oldest stage studied.

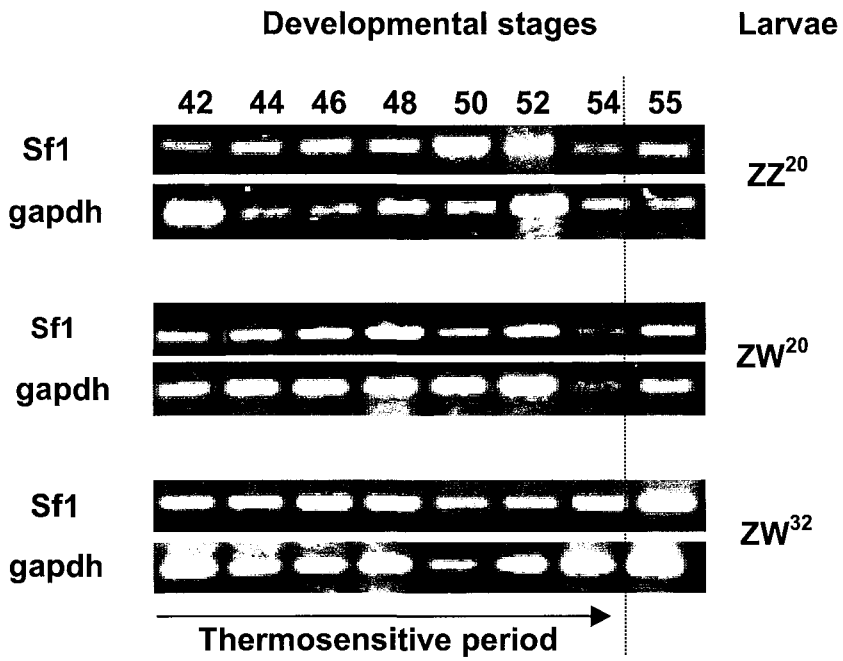



**FIG. 6.** Qualitative analysis of *Sf1* mRNA expression in brain of $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae.

The presence of *Sf1* transcripts was studied from stage 42 to 54 of TSP and at stage 55. Total RNA was isolated from pools of four larval brains each, reverse transcribed and amplified by PCR for 35 cycles and *gapdh* serves as a positive control.

Semi-quantitative RT-PCR was performed at stages 54 and 55 in the conditions used for the analysis in gonad-mesonephros complexes. We detected no significant difference in the amount of *Sf1* mRNAs between the different larvae whatever the stage, the genotypic sex or the rearing temperature condition (Fig 7), suggesting that *Sf1* cerebral expression is not involved in the sex-dependent differential response of larvae to heat treatment.

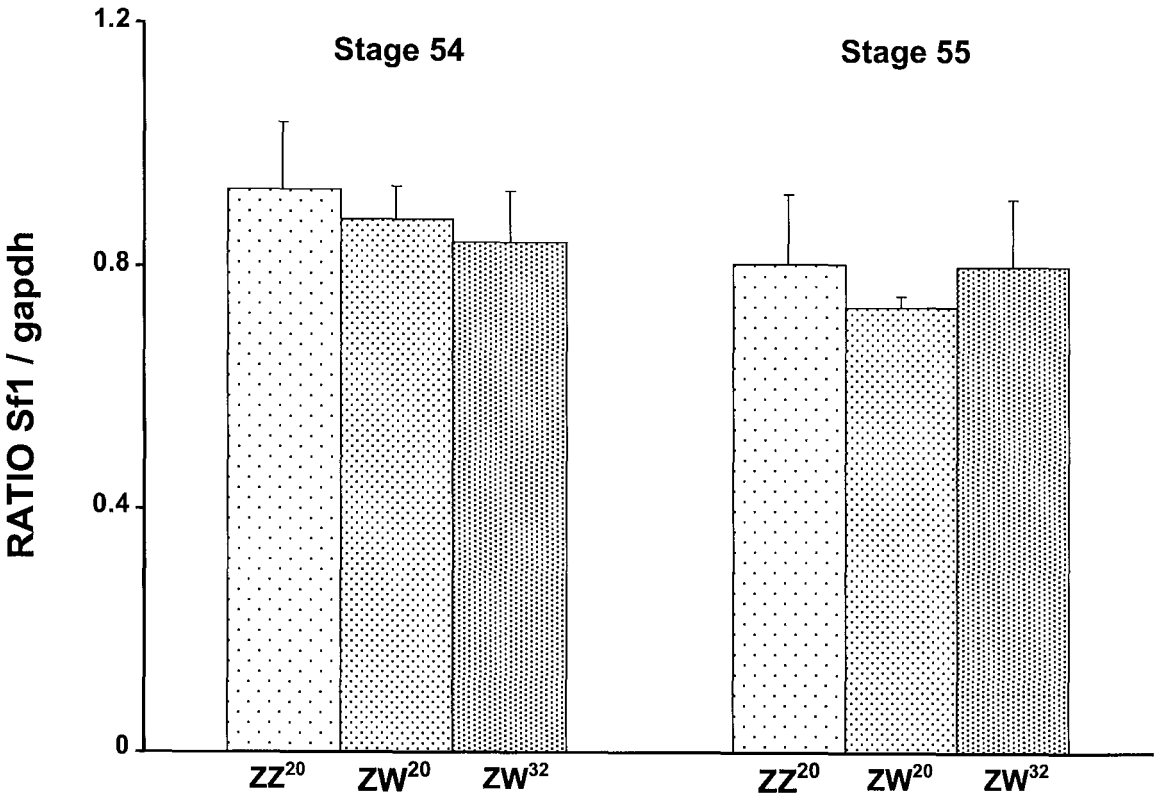



**FIG. 7.** Semi-quantitative analysis of *Sf1* mRNA expression in brain of $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae at stages 54 and 55.

Relative amounts of *Sf1* mRNA were normalized to *gapdh*. For each experiment, RT-PCR analysis was performed in four replicates of four larval brains each. Vertical bars indicate the mean standard error. Total *Sf1* expression was not significantly different between $ZZ^{20}$ larvae and $ZW^{20}$ larvae at stage 54 or at stage 55. Temperature has no apparent effect on *Sf1* expression since no significant differences were seen either at stage 54 in $ZZ^{20}$ *vs* $ZW^{20}$ larvae, or at stage 55 in $ZZ^{20}$ *vs* $ZW^{20}$ larvae.

**Discussion**

Little is known about steroidogenic factor 1 in amphibians and its involvement in the regulation of steroid hormone synthesis has still to be demonstrated in *Pleurodeles waltl* species. Whether *Sf1* could be involved in the transcriptional regulation of *aromatase* in *P. waltl* is one of the questions we address here, and our model allows the use of temperature as a very useful screen. This work was performed in order to establish whether *Sf1* could constitute a target of the masculinizing temperature, standing upstream of the temperature sensitive *aromatase* expression. We first have cloned a *Sf1* cDNA from *Pleurodeles waltl* adult testis and examined its gonadal and cerebral expression during sexual differentiation. The *Pleurodeles Sf1* cDNA contains an open reading frame that could encode a protein of 468 amino acids. Sequence identity of *Pleurodeles* putative SF1 compared to that found in other vertebrates showed a high homology ranging from 81% in *Trachemys scripta* to 63% in human and mouse and 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.

SF1 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 adrenal in mouse, chicken, the turtle *Trachemys scripta* and frog (Kawano et al, 1998; Mayer et al, 2002; Smith et al, 1999; Fleming et al, 1999; Ingraham et al, 1994). In agreement with this finding, *Pleurodeles Sf1* transcripts were detected in all adult steroidogenic tissues (Kuntz et al., 2004). In addition, *Sf1* was expressed in *Pleurodeles* spleen, as in *Rana rugosa* species (Kawano et al, 1998), and surprisingly, in *Pleurodeles* lung, where aromatase transcripts were also shown to be expressed (Kuntz et al, 2004). These results suggest a role of *Sf1* in steroid hormone synthesis pathway. However, *Pleurodeles* SF1 target genes remain to be discovered.

As soon as stage 42, qualitative expression analysis revealed the presence of *Sf1* mRNAs in gonads of $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ or $ZW^{32}$. Then, this sex and temperature-independent signal was observed at all stages of TSP. This result is consistent with those obtained in mouse where *Sf1* transcripts are present from 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), in the turtle *Trachemys scripta* (Fleming et al, 1999), in alligator (Western et al, 2000) and in *Rana catesbeiana* (Mayer et al, 2002). The early presence of *Sf1* mRNA is probably correlated to its role in the early differentiation of the two primary steroidogenic organs : the gonads and adrenal (Luo et al, 1994).

Further, gonadal expression occurs before expression of known *Sf1* steroidogenic target genes (Parker and Schimmer, 2002).

After the onset of gonadal sex differentiation, the *Sf1* expression pattern becomes sexually dimorphic in several species. In mouse embryos, *Sf1* expression persists during testicular differentiation, whereas it declines during ovarian differentiation (Ikeda et al, 1994). A similar pattern was found in other mammals (Hatano et al, 1994; Hanley et al, 1999; Pilon et al, 1998) and in turtle *Trachemys scripta* (Fleming et al, 1999). In contrast to that situation, chicken (Smith et al, 1999), alligator (Western et al, 2000), and *Rana catesbeiana* (Mayer et al, 2002) showed a higher *Sf1* expression level in female gonads. *Pleurodeles waltl* is related to this second group of species since our semi-quantitative analysis showed that the level of *Sf1* transcripts increases during ovarian differentiation. It should be kept in mind that this sexual dimorphic expression was detected at stage 55, after the first signs of histological sex differentiation which occur at stage 53.

The dimorphic *Sf1* expression appears to be correlated with the level of steroidogenic activity that should be necessary to support sexual development. In chicken embryos indeed, the developing ovary displays a higher steroidogenic activity than the testis (Guichard et al, 1979) while the opposite is observed in mammals (Jost, 1970).

A target for SF1 during gonadal development should be the gene encoding aromatase since both genes display a concomitant upregulation of their expression as observed in chicken (Yoshida et al, 1996; Andrews et al, 1997; Smith et al, 1997; Smith et al, 1999) and in mammals (Lynch et al, 1993; Michael et al, 1995; Fitzpatrick and Richards, 1993). Moreover, a putative SF1 binding site has been identified in the promoter region of chicken *aromatase* gene (Kudo et al, 1996). In *Pleurodeles* too, the *aromatase* and *Sf1* expression patterns appear to be closely related, both increasing during early ovarian differentiation. However, the increase in aromatase mRNA level occurs earlier than those of *Sf1*, respectively at stage 54 (Kuntz et al, 2003b) and at stage 55 (this work). This result suggest that, after the onset of ovarian differentiation, estrogens resulting from overexpression of aromatase around stage 53 could positively regulate SF1 production and as a consequence, enhance global steroidogenic production in this organ. In the red eared slider turtle indeed, estrogens were shown to modulate the regulation of *Sf1* expression since a treatment with estradiol applied at a male producing temperature resulted in upregulation of *Sf1* and female hatching (Fleming and Crews, 2001). However, whether estrogens had a direct or indirect effect on *Sf1* expression in that case is not known.

What about our hypothesis that *Sf1* could be a target gene of temperature able to explain the decrease in aromatase expression in heat treated animals ? In our model, we detect a significant

decrease in *Sf1* expression in $ZW^{32}$ larvae, however this appears at stage 55, after the decrease in aromatase expression (Kuntz et al., 2003b). This result could be due to the defect in aromatase expression and hence, in estrogen synthesis induced under the effect of heat treatment during the TSP, supporting the hypothesis of a regulation of *Sf1*expression *via* the estrogen hormones level. It is interesting to note that temperature can modify *Sf1* expression in different ways : in *Trachemys scripta*, *Sf1* mRNAs increase at male producing temperature (Fleming et al, 1999) whereas in *Pleurodeles waltl,* temperature treatment has also a masculinizing effect and induces a decrease in *Sf1* expression.

Are our findings really inconsistent with a possible regulation of aromatase expression by SF1 in *P. waltl* ? This question will await further studies at the cellular level to be answered since it was not possible to separate efficiently the gonads from mesonephos at each of the developmental stages included into the TSP. *Sf1* expression also occurs in mesonephros and this could mask changes occurring specifically in the gonads even if at stage 55, the analysis of isolated gonads was rather similar to those of the mesonephros-gonads complexes. We assume here that an actual *Sf1* expression is present early during the development of the gonad and consequently that it could be involved in *aromatase* regulation.

*Sf1* has also been implicated in neural development since in *Ftz-F1* disrupted mice a malformed structure of the ventromedial hypothalamus is observed (Ikeda et al, 1995; Shinoda et al, 1995). *Sf1* transcripts were present in periventricular nucleus of hypothalamus in mammals (Roselli et al, 1997; Parker and Schimmer, 2002), in bird *Zebra finch* (Agate et al, 2002) and in turtle *Trachemys scripta* (Crews et al, 2001). Our qualitative RT-PCR investigation reports an *Sf1* expression in brain of *Pleurodeles* during the TSP and *Sf1* transcripts were detected as soon as stage 42 in $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ larvae. Then, expression was maintained in all the following stages. This is in agreement with the usual expression of *Sf1* in vertebrates brain.

Recently, the brain has been suggested to be involved in sex determination in TSD turtle. In *Trachemys scripta*, this organ seems to be a site of aromatase response to temperature since differential aromatase activity was detected in brain during TSP whereas no differential activity was observed in gonads (Crews et al, 2001; Willingham et al, 2000). In the same way, in the turtle diamonback terrapin, aromatase transcripts were more abundant in brain of putative female than putative male early in the TSP (Jeyasuria and Place, 1997). Furthermore, in adult brain of *Zebra finch*, aromatase and *Sf1* were coexpressed in hypothalamus but not in telencephalon, suggesting that SF1 regulate aromatase expression only in hypothalamus (Agate et al, 2002). We

hypothesized that in *Pleurodeles,* temperature dependent sex-reversal, temperature could be able to reverse ovarian differentiation by acting on the brain specific estrogen production, particularly by down regulating *Sf1* and/or aromatase or other steroidogenic target genes. Our semi-quantitative RT-PCR analysis did not show any differential expression in brain from $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ and $ZW^{32}$ *Pleurodeles* larvae taken at the beginning of sex-specific gonadal differentiation. This result was similar to that observed for aromatase expression (under publication). So, the cerebral expressions of both Sf1 and aromatase are stable, in $ZZ^{20}$ and $ZW^{20}$ as well as in $ZW^{32}$ larvae, whereas changes in the expression of these genes are observed at the same time in the gonads of these animals. This suggests that the brain does not interfere in a preponderant manner in the sexual determination or differentiation of the gonad in *Pleurodeles waltl.*

This work brings a new light on the actors that can play a role in *Pleurodeles waltl* gonadal differentiation although aromatase and estrogens 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 *Sf1* in the complex way of ovarian differentiation and/or determination.

## Experimental Procedures

*Animals*

Adult *Pleurodeles waltl* were reared in fresh water at a controlled temperature of 20±2°C ($ZZ^{20}$ and $ZW^{20}$) in our laboratory. Developmental stages were determined by macroscopic observation according to Gallien and Durocher (Gallien and Durocher, 1957) and the sexual genotype was determined by electrophoretic patterning of the sex-linked peptidase-1, as described previously (Chardard et al, 1995). Heat treatment of ZW larvae was run at 32°C ($ZW^{32}$) during the whole TSP, from stage 42 to stage 54 while other ZW or ZZ larvae were maintained at 20±2°C as a control ($ZW^{20}$, $ZZ^{20}$). Before dissection, animals were anaesthetized in a solution of benzocaïne (0.03%) and the brain or gonad-mesonephros complex were dissected for further analysis. Due to their small size, gonads could not be isolated from the mesonephros before stage 55.

*Sf1 cDNA isolation*

One microgram of total RNA from adult testis was reverse transcribed using oligo($dT_{15}$) primers and Superscript II mouse moloney leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Invitrogen). An aliquot of the reaction was amplified by polymerase chain reaction (PCR) by using the degenerated primers *Sf1*-1 5'-TGYAARGGITTYTTYAARMGIAC-3', Sf1-2 5'-

AARTTYGGICCIATGTAYAA-3' and Sfl-4 5'-TCISWCCARCARTTYTG-3'. The amplification was performed in the presence of 0.1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each dNTP and 3.5 mM $MgCl_2$ . 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 pursued with 30 cycles at 94°C for 1 min, 40°C for 1 min and 72°C for 1 min. Two independent fragments were obtained by using different set of primers, Sfl-2/Sfl-4 (657 bp) and Sfl-1/Sfl-4 (800 bp). After agarose gel electrophoresis, the expected fragments were excised from the gel, inserted into either the plasmids pCR2 or pBLUESCRIPT (Invitrogen) and transfected in *E.coli* strains INVα or HB101 (Invitrogen), and both were sequenced (Genome express).

The 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) system (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech) was used to amplify 5'-end and 3'-end of *Sfl* cDNA synthesized from 1 µg of total RNA isolated from adult testis according to manufacturer's instructions. PCR was performed with 1 unit Taq DNA Polymerase (Advantage 2 Polymerase Mix, Clontech) and specific primer for each amplification in 5'-end region: Sfl-5R 5'-CTGGTCGGCCATCTTGCACATGAGGCC-3' and in 3'-end region: Sfl-3R 5'-CTGGAAGCGGTGCGGGCAGACAGG-3'. 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, 72°C for 3 min and a final extension at 72°C for 10 min. Two fragments of 900 bp and of 1.2 kb isolated from 5' and 3' region 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 reverse transcription has been previously described (Kuntz et al, 2003b). Total RNA was extracted from dissected tissues by using TRIzol reagent (Invitrogen) and quantified (BioPhotometer, Eppendorf). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed by using random hexanucleotide primers and 100 units of MMLV reverse transcriptase in a total volume of 25 µl. A 2 µl aliquot of resultant cDNA was PCR amplified with 0.1 unit of Taq DNA Polymerase in PCR buffer containing 25 mM of each dNTP, 2.5 mM $MgCl_2$ and 0.4 pM of each primer in a total volume of 25 µl. Specific primers for *Pleurodeles waltl* were Sfl-1 5'-GGGTACACCTACCCACACTT-3' and Sfl-5 5'-TCTTGGCCTGTGACCAGGAG-3' and led to a PCR product of 462 bp in length. This product encompasses one exon / intron boundary

based on other vertebrate *Sf1* genes alignment (not shown). In order to ensure that the RNA was not degraded or to prevent poor transcription quality, gapdh was used as a control (primers 5'-ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3' and 5'-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3' leading to a 290 bp fragment). The PCR conditions were 30 sec denaturation at 94°C, 30 sec annealing and 2 min elongation at 72°C. Annealing temperatures were 52°C for *gapdh* and 60°C for *Sf1*. We realized 35 cycles for qualitative analyses and 26 or 28 cycles for semi-quantitative analyses in gonads and brain respectively (in that case, the amplification takes place in the linear phase of the PCR reaction). PCR products were run in a 1% agarose gel and either directly observed or transferred to nylon membrane (Hybond-N, Amersham) before hybridization with DIG-labeled probes and detection by chemoluminescence using previously described conditions (Kuntz et al, 2003b). The intensity of the hybridization signal was measured and the relative amounts of *Sf1* mRNAs were normalized to gapdh ones by using the GelDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories) and a software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories).

*Statistical analysis*

The results are expressed as mean +/- standard error of several experiments as indicated in the text. The variation of expression between samples was analyzed by Student's *t*-test.

## Acknowledgments

We thank Jean-Charles Olry and Alain Iurétig for animal rearing.

### Reference List

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. Nat.Genet. 22:125-126.

Agate RJ, Perlman WR, Arnold AP. 2002. Cloning and expression of zebra finch (Taeniopygia guttata) steroidogenic factor 1: overlap with hypothalamic but not with telencephalic aromatase. Biol.Reprod. 66:1127-1133.

Andrews JE, Smith CA, Sinclair AH. 1997. Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. Gen.Comp Endocrinol. 108:182-190.

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.

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.

Dournon C, Houillon C. 1984. Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltl* Michah. Reprod.Nutr.Dev. 24:361-378.

Fitzpatrick SL, Richards JS. 1993. Cis-acting elements of the rat aromatase promoter required for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induction in ovarian granulosa cells and constitutive expression in R2C Leydig cells. Mol.Endocrinol. 7:341-354.

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. Gen.Comp Endocrinol. 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. C.R.Hebd.Seances Acad.Sci. 233:828-830.

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

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

Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, Hagan DM, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker KL, Wilson DI. 1999. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilm's tumor 1 during early human gonadal development and sex determination. Mech.Dev. 87:175-180.

Hatano O, Takayama K, Imai T, Waterman MR, Takakusu A, Omura T, Morohashi K. 1994. Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, 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. Mol.Endocrinol. 7:852-860.

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. Mol.Endocrinol. 9:478-486.

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.

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 Dev. 8:2302-2312.

Jeyasuria P, Place AR. 1997. Temperature-dependent aromatase expression in developing diamondback terrapin (Malaclemys terrapin) embryos. J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 61:415-425.

Jost A. 1970. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci. 259:119-130.

Kawano K, Miura I, Morohashi K, Takase M, Nakamura M. 1998. Molecular cloning and expression of the SF-1/Ad4BP 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. Reprod.Dev. 42:101-107.

Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Ducatez M, Callier M, Flament S. 2004. Expression of aromatase and steroidogenic factor 1 in the lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl.* Endocrinology, in press.

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.

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. Mol.Endocrinol. 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. Mol.Endocrinol. 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. Gen.Comp Endocrinol. 127:40-47.

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.

Morohashi K, Honda S, Inomata Y, Handa H, Omura T. 1992. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. J.Biol.Chem. 267:17913-17919.

Parker KL, Schimmer BP. 2002. Genes essential for early events in gonadal development. Ann.Med. 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.

Roselli CE, Jorgensen EZ, Doyle MW, Ronnekleiv OK. 1997. Expression of the orphan receptor steroidogenic factor-1 mRNA in the rat medial basal hypothalamus. Brain Res.Mol.Brain Res. 44:66-72.

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. Dev.Dyn. 204:22-29.

Smith CA, Andrews JE, Sinclair AH. 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 60:295-302.

Smith CA, Smith MJ, Sinclair AH. 1999. Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. Gen.Comp Endocrinol. 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). J.Biochem.(Tokyo) 117:719-725.

Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A. 2003. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. Nucl.Recept. 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. 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.

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. Gen.Comp Endocrinol. 119:202-207.

Yoshida K, Shimada K, Saito N. 1996. Expression of P450 (17 alpha) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. Gen.Comp Endocrinol. 102:233-240.

Yoshiura Y, Senthilkumaran B, Watanabe M, Oba Y, Kobayashi T, Nagahama Y. 2003. Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, Oreochromis niloticus, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. Biol.Reprod. 68:1545-1553.

Zaborski P. 1986. 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.

## 2) Etude de l'expression de Sox9 au cours de la différenciation sexuelle chez Pleurodeles waltl

(non soumis)

### A) Introduction

SOX9 est un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans la chondrogénèse et la différenciation testiculaire. La mutation de ce gène chez l'humain est responsable du syndrome de dysplasie campomélique (CD) caractérisé par des malformations squelettiques et des défauts de formation du cartilage avec une inversion sexuelle des individus XY dans 75% des cas (Foster J.W. *et al.*, 1994; Wagner T. *et al.*, 1994; Tommerup N. *et al.*, 1993). L'implication de Sox9 dans la différenciation testiculaire a été démontrée chez les mammifères, les oiseaux mais aussi les espèces TSD. En effet, Sox9 est surexprimé dans les gonades mâles au moment de la différenciation sexuelle chez la souris (Morais da Silva S. *et al.*, 1996; Kent J. *et al.*, 1996), le wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2002), le poulet (Kent J. *et al.*, 1996), les tortues *Trachemys scripta* et *Lepidochelys olivacea* (Spotila L.D. *et al.*, 1998; Moreno-Mendoza N. *et al.*, 1999) et l'alligator (Western P.S. *et al.*, 1999a).

Chez les mammifères, la chronologie et la spécificité cellulaire de son expression suggèrent que Sox9 agit en aval de Sry et qu'il est important pour la différenciation des cellules de Sertoli. Il est notamment impliqué dans la régulation de l'expression du gène de l'AMH, un des premiers marqueurs de la différenciation des cellules de Sertoli (De Santa Barbara P. *et al.*, 1998). Sox9 peut même se substituer à Sry en dirigeant la détermination mâle d'une souris XX lorsqu'il est exprimé ectopiquement sous le contrôle de la région régulatrice de Wt1 (Vidal V.P. *et al.*, 2001) et chez les mutants Ods/+ (Bishop C.E. *et al.*, 2000). De même, chez la tortue *Lepidochelys olivacea*, le maintien de l'expression de Sox9 dans les gonades à température masculinisante est corrélé avec la période de la détermination du sexe (Moreno-Mendoza N. *et al.*, 1999).

Cependant, la fonction de Sox9 pourrait sensiblement varier selon les espèces. Effectivement, chez le poulet, l'expression de Sox9 apparaît après celle de l'AMH suggérant que chez cette espèce, Sox9 n'est pas essentiel dans la régulation de l'expression de cette hormone (Oreal E. *et al.*, 1998). Chez l'alligator et le lézard *Eublepharis macularius*, Sox9 semble jouer un rôle plus tardif dans la différenciation testiculaire puisque l'expression dimorphique de Sox9 n'apparaît qu'après le début de la différenciation testiculaire (Western P.S. *et al.*, 1999a; Valleley E.M. *et al.*, 2001). Il en est

de même chez la grenouille *Rana rugosa*, où le niveau de transcrits est similaire entre les gonades mâles et femelles au cours du développement, l'augmentation testiculaire n'étant détectée que deux mois après la métamorphose (Takase M. *et al.*, 2000). En outre, Sox9 pourrait jouer un rôle dans la spermatogénèse comme chez le rat (Frojdman K. *et al.*, 2000) ainsi que dans la différenciation des glandes mammaires et du scrotum comme chez le wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2002). Chez le medaka, Sox9 n'intervient que dans la formation du cartilage puisqu'aucun transcrit n'a été détecté dans les gonades au cours du développement (Yokoi H. *et al.*, 2002). Afin de définir son implication au cours de la différenciation gonadique chez *Pleurodeles waltl*, nous avons cloné ce gène et examiné son expression au cours du développement.

## B) Matériel et Méthodes

### *a) Animaux*

Les pleurodèles adultes sont élevés dans l'eau courante à 20±2°C dans notre laboratoire.

Un lot de larves témoins ZZ et ZW a été maintenu à 20°C±2°C ($ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$), température d'élevage où le sexe phénotypique est conforme au sexe génétique. Un autre groupe de larves ZW a été élevé à 32°C pendant toute la période thermosensible, du stade 42 au stade 54 ($ZW^{32}$).

Avant la dissection, les animaux sont anesthésiés dans une solution de benzocaïne (0,03%). Pour les animaux adultes, différents organes ont été prélevés : cerveau, cœur, foie, rein, rate, testicule, ovaire, intestin et poumons. Chez les larves, les études ont été réalisées sur le complexe gonades-mésonéphros jusqu'au stade 54 à cause de la petite taille des gonades. En effet, les gonades sont difficilement dissociables du mésonéphros, par dissection manuelle à la pince, avant le stade 55. Au stade 55, les complexes gonades-mésonéphros ainsi que les gonades isolées ont été examinés.

### *b) Clonage du gène Sox9*

Un premier fragment de Sox9 obtenu par PCR à l'aide des amorces Sox9-up 5'-CAGCACTCCCCCCAGCAGCT-3' et Sox9-dw 5'-ATAGACTGGGTGCTCCCAGT-3', nous a été généreusement fourni par Mr P. Berta du laboratoire de Montpellier. Le produit de PCR contient 290 pb.

La plus grande partie du cDNA de Sox9 a été obtenue après le criblage d'une banque d'expression du stade bourgeon caudal réalisée par J.F. Riou du laboratoire de Biologie du Développement de l'université Paris VI, dans le vecteur lambda ZAPII (Stratagene). Après un étalement de la banque (~ $10^6$ clones) qui a été réalisé par une infection de la bactérie XL1, le criblage a été effectué par hybridation avec une sonde froide. Pour ce faire, les phages ont été transférés par capillarité sur une membrane Hybond N (Amersham). Après les deux étapes successives de dénaturation (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) et neutralisation (NaCl 1,5 M, Tris-HCl pH 7,5 0,5 M) pendant 5 minutes chacune, la membrane a été lavée dans une solution de SSC 2x pendant 15 minutes puis l'ADN a été fixé pendant 2 heures à 80°C. La membrane a ensuite été préhybridée puis hybridée avec une sonde SOX9 marquée à la digoxygénine et révélée en chimioluminescence selon les conditions décrites précédemment (voir partie résultats I.1). Les plages de lyse positives ont été carottées à l'aide d'une pipette Pasteur et incubées pendant 16 heures dans 100 µl de SM (NaCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, $MgSO_4$ 10 mM). Trois cycles identiques de criblage ont ensuite été réalisés afin d'obtenir un clone pur. A partir de cette banque, deux clones SOX9, 2A et 3A, ont été isolés. Puis, trois sous-clones 2A (a, b, c) et deux sous-clones 3A (d, e) ont été retenus. Ensuite, le plasmide comportant l'insert inclus dans le phage λ ZAP II, d'une taille approximative de 2,6 kb pour 2A et 2,8 kb pour 3A, a été récupéré par "excision" *in vivo* à l'aide d'un phage helper. Après cette étape, une carte de restriction a été réalisée sur le sous-clone 3Ae retenu pour sa grande taille. La présence de deux sites *Sac*I et de deux sites *Pst*I a permis d'obtenir 3 sous-clones : PwSS106 de 400 pb, PwPP207 de 654 pb et PwPX305 d'environ 1,5 kb qui ont été séquencés (Genome Express).

L'utilisation de la technique de RACE-PCR (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech) nous a permis d'obtenir un fragment supplémentaire dans la partie 5' manquante de l'ADNc de Sox9. Pour ce faire, 1µg d'ARNs totaux de testicule adulte a été rétrotranscrit puis amplifié à l'aide des amorces spécifiques Sox9-5R 5'-GGAGCTCTGGCCAGCAGCGTGGCT-3' puis Sox9-5R2 5'-GGCCAGCCAGGCATGGGCTGGAGCCCC-3' (Fig.28). Une première amplification a été réalisée avec l'amorce Sox9-5R dans un mélange contenant 1 unité de Taq polymérase (Advantage 2 Polymerase Mix, Clontech) selon le programme PCR suivant :

**94°C 3 minutes**
**94°C 30secondes**
**72°C 3minutes** } 5 cycles
**94°C 30secondes**
**70°C 30secondes** } 5 cycles
**72°C 3minutes**
**94°C 30secondes**
**68°C 30 secondes** } 30 cycles
**72°C 3minutes**

Ensuite, un aliquot dilué de la PCR précédente a été réamplifié pendant 25 cycles à l'aide de l'amorce Sox9-5R2 selon le programme suivant : 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 68°C et 3 minutes d'élongation à 72°C. Un premier fragment de 564 pb a été obtenu, inséré dans le plasmide pGEMT-easy puis séquencé (Genome Express). Comme ce clone était encore incomplet, la répétition de la PCR, nous a permis d'obtenir un deuxième fragment plus long de 900 pb qui a aussi été cloné dans le plasmide pGEMT-easy et séquencé (Genome Express).

*c) Analyse par RT-PCR*

Le protocole détaillé a déjà été décrit précédemment (voir partie résultats I.1). Lors de cette étude, des «pools» de 5 complexes gonades-mésonéphros ou de 5 gonades isolées, et des «pools» de 4 cerveaux ont été constitués pour les larves. En ce qui concerne les tissus adultes, un fragment de chaque organe a été prélevé. Les ARN des différents échantillons ont ensuite été extraits en utilisant la technique au TRIzol (Invitrogen).

La rétrotranscription (RT) a été réalisée à partir de quantités différentes d'ARNs totaux : 3µg pour les tissus adultes et les cerveaux larvaires et 1µg pour les complexes gonades-mésonéphros ou les gonades seules. Lors de cette réaction, des amorces aléatoires et 100 unités de transcriptase inverse MMLV (Invitrogen) ont été utilisés dans un volume de 25 µl. Ensuite, un aliquot de 2µl d'ADNc a été amplifié avec 0,1 unité de Taq Polymerase (Invitrogen) dans un tampon contenant 25 mM de chaque dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$ et 0,4 pM de chaque amorce dans un volume total de 25 µl. Le couple d'amorce utilisé Sox9-3 5'GAGGGCTCCGAGCAAACGCAC-3' et Sox9-4 5'-GCTCTGCTCGCTGCCCAGTGT-3' donne un fragment de 504 pb (Fig.28). Le gène de la Gapdh a été choisi comme témoin interne de PCR (amorces 5'-ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3' et 5'-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3' conduisant à un fragment de 290 pb). Le programme PCR est le suivant : 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation et 1 minute d'élongation à 72°C. La

température d'hybridation est de 52°C pour la Gapdh et de 66°C pour Sox9. Le témoin Gapdh est amplifié pendant 24 cycles. En ce qui concerne Sox9, 35 cycles sont effectués pour les analyses qualitatives et 26 ou 28 cycles pour les analyses semi-quantitatives.

Les produits de PCR obtenus (10µl) sont déposés sur un gel d'agarose à 1% puis sont ensuite soit directement observés sur gel, soit transférés sur une membrane de Nylon (Hybond-N, Amersham) avant d'être hybridés avec des sondes marquées à la DIG et détectés par chimioluminescence selon les conditions décrites précédemment (voir partie résultats I.1). L'intensité du signal a été mesurée par l'utilisation du GelDoc 2000 et quantifiée grâce au logiciel "Quantity One" (Bio-rad). Les quantités relatives de transcrits Sox9 ont été normalisées par rapport au témoin Gapdh.

*d) Analyses statistiques*

Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme représentant la moyenne des rapports Sox9 / Gapdh. L'écart-type moyen de chaque expérience est indiqué par une barre sur l'histogramme. Les variations d'expression entre les différents groupes ont été analysées par le test de Student.

```
                                        CAA CGC AGA GTA CGC GGG ATG AAC GCC TTC ATG GTG TGG GCG CAG GCG
                                          Q   R   R   V   R   G   M   N   A   F   M   V   W   A   Q   A

GCG CGC AGG AAG CTG GCC GAC CAG TAC CCG CAC CTG CAC AAC GCC GAG CTC AGC AAG ACA CTG GGC AAG
 A   R   R   K   L   A   D   Q   Y   P   H   L   H   N   A   E   L   S   K   T   L   G   K

CTC TGG AGG CTG CTG AAT GAG GGC GAG AAG CGC CCC TTT GTG GAG GAA GCA GAG AGA CTG CGT GTC CAG
 L   W   R   L   L   N   E   G   E   K   R   P   F   V   E   E   A   E   R   L   R   V   Q

CAC AAG AAG GAC CAC CCG GAC TAC AAG TAC CAG CCC CGC AGG CGG AAG TCT GTG AAG AAC GGC CAG GCG
 H   K   K   D   H   P   D   Y   K   Y   Q   P   R   R   R   K   S   V   K   N   G   Q   A
                 Sox9-3 ------------------>
GAG ACG GAG GAG GGC TCC GAG CAA ACG CAC ATC TCT CCC AAC GCC ATC TTC AAG GCG CTG CAG GCC GAC
 E   T   E   E   G   S   E   Q   T   H   I   S   P   N   A   I   F   K   A   L   Q   A   D

TCA CCG CAC TCA TCA TCC GGC ATG AGC GAG GTG CAC TCG CCC GGA GAG CAC TCT GGC CAG TCC CAG GGT
 S   P   H   S   S   S   G   M   S   E   V   H   S   P   G   E   H   S   G   Q   S   Q   G

CCA CCC ACA CCT CCA ACT ACC CCA AAA ACC GAC GTT CAG CCA GGG AAA CCT GAC CTG AAG CGG GAA GGA
 P   P   T   P   P   T   T   P   K   T   D   V   Q   P   G   K   P   D   L   K   R   E   G

CGC CCT CTC CAG GAG GAA GGG AGA CAG CCT CCC CAC ATT GAC TTC GGG GAT GTG GAC ATC TCG GTG CTG
 R   P   L   Q   E   E   G   R   Q   P   P   H   I   D   F   G   D   V   D   I   S   V   L

AGC AGT GAC GTC ATC TCT AAC TTT ACT CCC ATC GAC ATC CAG GAG TTT GAT CAA TAC CTT CCG CCC AAC
 S   S   D   V   I   S   N   F   T   P   I   D   I   Q   E   F   D   Q   Y   L   P   P   N

AGC CAC CCT GGT GTG CCC ACA ACC CAT GGG CAG GCT GGA CCA GGT ACC TAT ACC AAC AGC TAC GGG GCT
 R   H   P   G   V   P   T   T   H   G   Q   A   G   P   G   T   Y   T   N   S   Y   G   A
                                        Sox9-5R2 <------------------
GGC AAC ACA GCA GCT CCC CAA CCT GGC GCT CCA GCC GAT GCC TGG CTG GCC AAA CAG CAA CAG CAG CAC
 G   N   T   A   A   P   Q   P   G   A   P   A   H   A   W   L   A   K   Q   Q   Q   Q   H
                 Sox9-4 <------------------
ACG TTG ACC ACA CTG GGC AGC GAG CAG AGC CAG GCG CAG CAG AGG ACA CAC ATC AAG ACC GAA CAA CTT
 T   L   T   T   L   G   R   E   Q   R   Q   A   Q   Q   R   T   H   I   K   T   E   Q   L
                                        Sox9-up ------------------>
AGC CCC ACA CAC TAC AGC GAG CAG CAG CAG CAC TGC GGC CAG CAG CTG AGC TAC AGC CCG TTC AAC CTG
 S   P   T   H   Y   S   E   Q   Q   Q   H   S   P   Q   Q   L   S   Y   S   P   F   N   L

CAG CAC TAC AAC TCT ACC TAC CCT ACT ATT ACA CGT GCG CAG TAT GAC TAC ACC GAC CAC CAG AGC TCT
 Q   H   Y   N   S   T   Y   P   T   I   T   R   A   Q   Y   D   Y   T   D   H   Q   S   S
                                Sox9-5R <------------------
AAC ACC TAC TAC AGC CAC GCT GCT GGC CAG AGC TCC AAC CTC TAC TCC ACT TTC TCC TAC ATG AAC CCC
 N   T   Y   Y   S   H   A   A   G   Q   S   S   N   L   Y   S   T   F   S   Y   M   N   P

ACT CAG CGC CCC ATG TAT ACC CCT ATT GCT GAC ACA ACA GGG GTT CCC TCC ATT CCA CAG ACC CAC AGC
 T   Q   R   P   M   Y   N   P   I   A   D   T   T   G   V   P   S   I   P   Q   T   H   S
                 Sox9-dw <------------------
CCC CAG CAC TGG GAG CAC CCA GTC TAT ACA CAG CTC ACC CGG CCT TAG ATGCCTTAAGCTGCTCCCAAGACTTAT
 P   Q   H   W   E   Q   P   V   Y   T   Q   L   T   R   P   .

GAGACATGGAAGGGGCCATCGTGGTTGAGAACCATGTTGGAAGGTCCAAGAACTTGTCCTCTGCACTACAGCTTGGGCTCAGAAGAGTGGT
CAGACGAACATTCGAAGGGGATTGTTGCCCCCTCTGGATCAGGTGGACTTGGTACATTCCAGGGGTCATCTCGGAAGTGAACTGTGATCTT
TGGTCACAACAGGACTGGAACGGAAGAAAATAAAGAGTTAGGATAACTAGCTCATTTTCAAGCGTTTTGTTGGCCTTATAGAACTTTTTTG
TAATTATTTTTATATAACAACAACTAAGGAAATCAAAAGAGAAAATCCTCTGTGAGGAATATTTTCCAATTGAATCCCATGGGTGTAATTC
TGCAGGAGAAAAGGGACAGGCTTTACCTCTGAATCCGTCCCACTGGCAGCCTCAGAAACATGCCTGCTTCTGCTTAACCGGCCTTTGTGTG
CAGAATTAAATCCACACATTGTAGTATATACTGTGTATGTTTCATCACTTTTTTGTGACGAGTTCTACATTATTTTTGGGAAATGCTTTTA
TAATGCTCTTAATGCTCTCCTTCCAATACACTATTTCCTCCTGGTGCTGTATACCCTGCTTTCTTGCAATCGAAGATATTTTTGTACAACT
CTCTTTCCATTACCTGAAAAAGCTAACCTTTATTTTGTTTAGCTATTGTTCATTTTGCATGTGTGATGCTGAATGAGATATTGCCTTGAGA
AAGAACATTTGGATGTAACTTGTTGGTTTCTGGCCAACTCTGTCATAGTAAAGTCAGGAAGTAAAATAGCTTTAGAAATATTTTTTCTAAA
AAAAAATTCTCTAAACACCAGTAGCCTTATGGGGGAAAGGAGTGCTTTATATAATACATAAGTGACCTTTGAAACTTTGGTACTGAAGGGT
GTTCACTGGGCGTATCTAGGCTGGGGATGGCCAAACCTGCATAGGCCAAATCTACCATCTGGAGATTTGGCACAGACTCGTGAATCACCAG
CCCCACCACCCTGTGTGGGAACCATGTGCACAACAGATGCGGCAAGTGTCCTTATACTGTCAACACCCACCTCCCAGTGAGGAATCTCTGC
ACACCCTTAAGATATTCACCACATGTACATTATTTATTTTGTACTAAACCATATCTGTAAAACGTTTTTTTTTCTGGAAAATTGCTAAAAA
AACGCGTCTTTAGATATTGACATGTTGCCAGAGGGTACTCTTGTTTACTGTTAAATTATGACTTCACTTCTAAATTGTTTTTTATTTATCT
CTATTCTTCTTACATGTTTCATTTGTTTGTTTTGTTGAGCCTGCTCCCTTCTTGTTTCTACAAACATGTTCCTCTTCTGTTGAAAAAAGT
TGTGTATTTTTGATGGGTGGATTTTGAACCTATGCAACACATCCCACTGTAGTGCTTCTGCTTCTCAACTCTTTCATCAATCCAGCATCTC
CACAGAACACCGTTTCCATCCCAGTTCCTCCTAAGCAATATGCTGTAATGCCCATGCAAAAGAAAACGAAATGAAAATGTTATTTTTTTTA
AATGCAGATGCTTTGCTAGACTTACATCCCTGTAGCTGAGCATTTCAATAACTGTTTTAAAAGAGATCAACATATATTTTTCTTTAAGAAA
ATGCACACTTGTTTTAACAGTGGTAGGTGGTCGGTAAAATTGAAATTCAAAGCACTCTTTTATTGTGTCATTTTTCATTTCTAAGTTAAAG
TGCCCTTTTCTTTTATTTTAACGTATTTCTTTAACTTAAAAATGTTTTACTTTGAAACCATATTTCTCCTCTGTAGGTGAGGTTTTTTTTT
ACAAAAAAGTTCTTTTTTGTGAAAGTACCCCCTTTTGTGTATTAATGTTTTGCAATAAATATAAATTGTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

**Figure 28 : Séquence partielle du cDNA de Sox9 de *Pleurodeles waltl.*** Les amorces utilisés en PCR sont figurées en gris et leur orientation à l'aide d'une flèche.

## C) Résultats

### *a) Clonage de l'ADNc de Sox9*

L'isolement incomplet de l'ADNc Sox9 a été réalisé en plusieurs étapes chez *Pleurodeles waltl* (Fig.28). La plus grande partie de l'ADNc a été obtenue grâce à une banque d'ADNc d'embryons de pleurodèles qui nous a aimablement été fournie par le Dr J.F. Riou du laboratoire de Biologie du Développement de l'université Paris VI. Cette banque a été réalisée sur des embryons au stade bourgeon caudal dans le vecteur λ ZAP II. Deux clones d'une taille approximative de 2,6 kb pour 2A et 2,8 kb pour 3A ont été récupérés par "excision" *in vivo* à l'aide d'un phage helper puis une carte de restriction a été dressée. Le clone le plus long, 3A, a été sous-cloné en trois parties grâce à la présence deux sites *Sac*I et de deux sites *Pst*I : PwSS106 de 400 pb, PwPP207 de 654 pb et PwPX305 d'environ 1,5 kb et ont été séquencés. Ce clone 3A nous a permis d'obtenir toute la partie 3' de l'ADNc Sox9. Cependant, la région 5' était toujours incomplète, il manquait environ 900 nucléotides. Afin de compléter l'extrémité 5' de la séquence Sox9, deux amorces spécifiques ont été choisies et utilisées en RACE-PCR. Le premier produit de PCR de 564 pb a permis d'obtenir 327 nucléotides supplémentaires dans la partie 5' de l'ADNc. Le deuxième essai de RACE-PCR, nous a donné un clone de 900 pb permettant d'obtenir 159 nucléotides supplémentaires. D'autres essais ont été réalisés sans plus de résultat : les différents clones étaient de taille attendue mais les séquences présentaient de nombreux codons stop.

Si l'on compare la séquence obtenue avec celle décrite chez plusieurs espèces, l'ADNc Sox9 partiel de pleurodèle semble comporter une région codante de 1131 pb susceptible de coder une protéine de 377 acides aminés. La région 3' non codante est très longue et comporte 1936 pb. La séquence en acides aminés déduite a été comparée à celle d'autres espèces : l'homme, le poulet, l'alligator, la grenouille *Rana rugosa* et la truite (Fig.29). Elle présente un haut degré de conservation, le plus fort taux d'identité de séquence étant observée avec l'alligator (83%). L'identité est ensuite de 80%, 78%, 74% et de 64% avec la grenouille, l'homme, le poulet et la truite respectivement. Les trois domaines conservés ont été retrouvés chez notre modèle : le domaine de liaison à l'ADN, le domaine de liaison avec la protéine HSP70 et le domaine de transactivation PQS dans la partie C-terminale de la protéine. Chez le pleurodèle, ces domaines présentent un fort pourcentage d'identité avec ceux des autres espèces de 91% à 93% pour la boite HMG, de 52% à 73% pour le domaine de liaison pour HSP70 et de 63% à 90% pour le domaine

PQS. Le domaine PQA, absent chez les poissons, la grenouille, l'alligator et les oiseaux est également absent chez le pleurodèle.

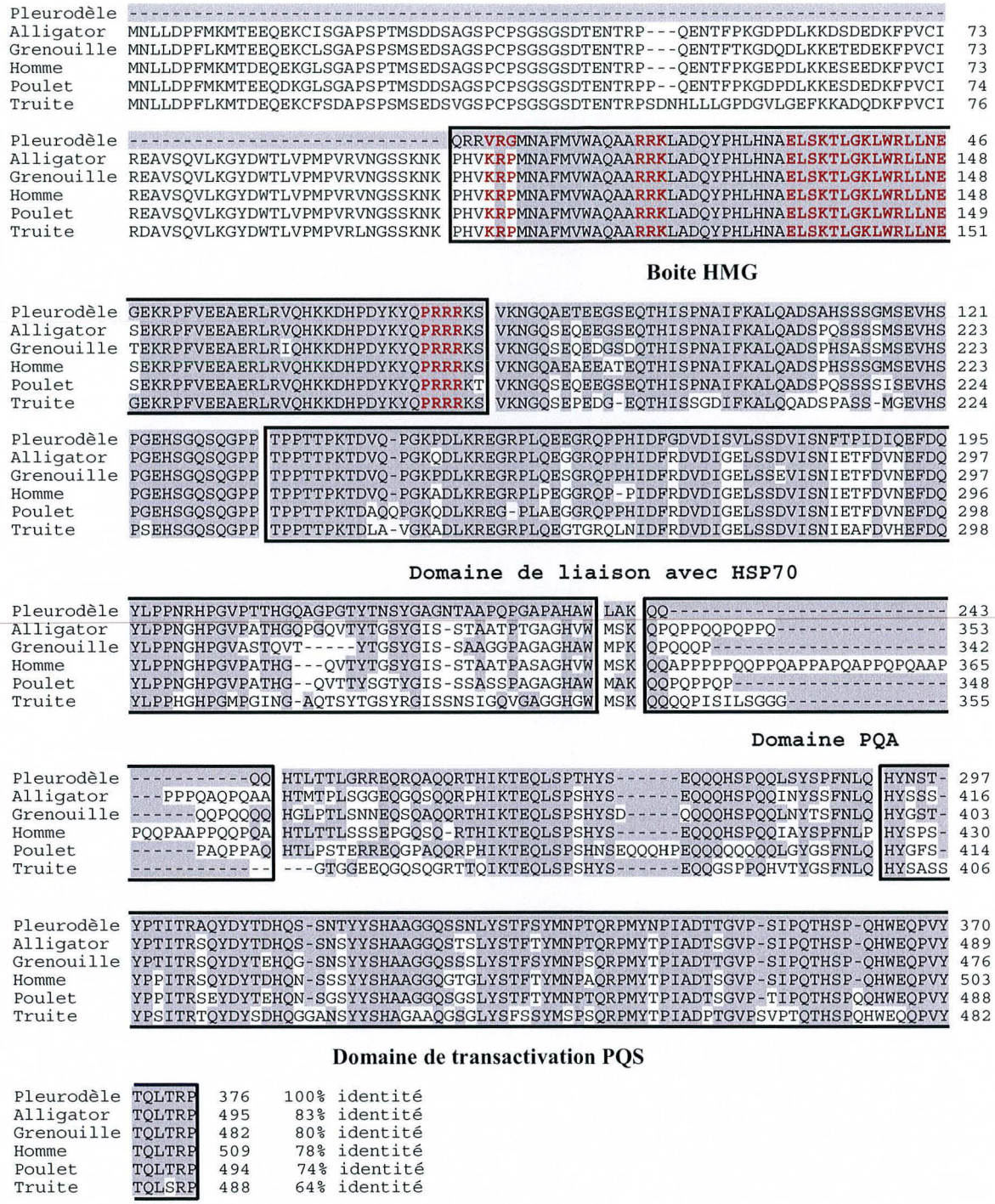



Figure 29 : Alignement de la séquence peptidique de SOX9 de *Pleurodeles waltl* avec celles de l'alligator, la grenouille *Rana rugosa*, l'homme, le poulet et la truite. Les acides aminés conservés avec ceux du pleurodèle sont figurés en grisé. Les deux régions conservées chez toutes les espèces : la boîte HMG, domaine de liaison à l'ADN, le domaine de liaison avec la protéine HSP70 et le domaine de transactivation PQS ainsi que le domaine PQA uniquement observé chez les mammifères sont encadrés. Les signaux de localisation nucléaire nNLS et cNLS à chaque extrémité de la boîte HMG et le signal d'export nucléaire NES au centre de la boîte HMG apparaissent en rouge.

*b) Sox9 est exprimé dans de nombreux tissus adultes*

L'expression du gène Sox9 a été étudiée dans différents tissus adultes : le foie (F), le cœur (Co), le rein (Re), l'ovaire (O), le testicule (T), l'intestin (I), le poumon (P), le cerveau (Ce) et la rate (Ra). Par RT-PCR qualitative, nous avons observé un signal dans le foie, le cœur, le rein, l'ovaire, le testicule, le poumon et le cerveau (Fig.30A). Une analyse semi-quantitative (26 cycles) a été réalisée sur les gonades et les cerveaux adultes d'individus mâles et femelles. Le niveau de transcrits n'est pas significativement différent entre les animaux mâles et femelles, ni pour les gonades (P=0,76), ni pour les cerveaux (P=0,62) (Fig.30B).

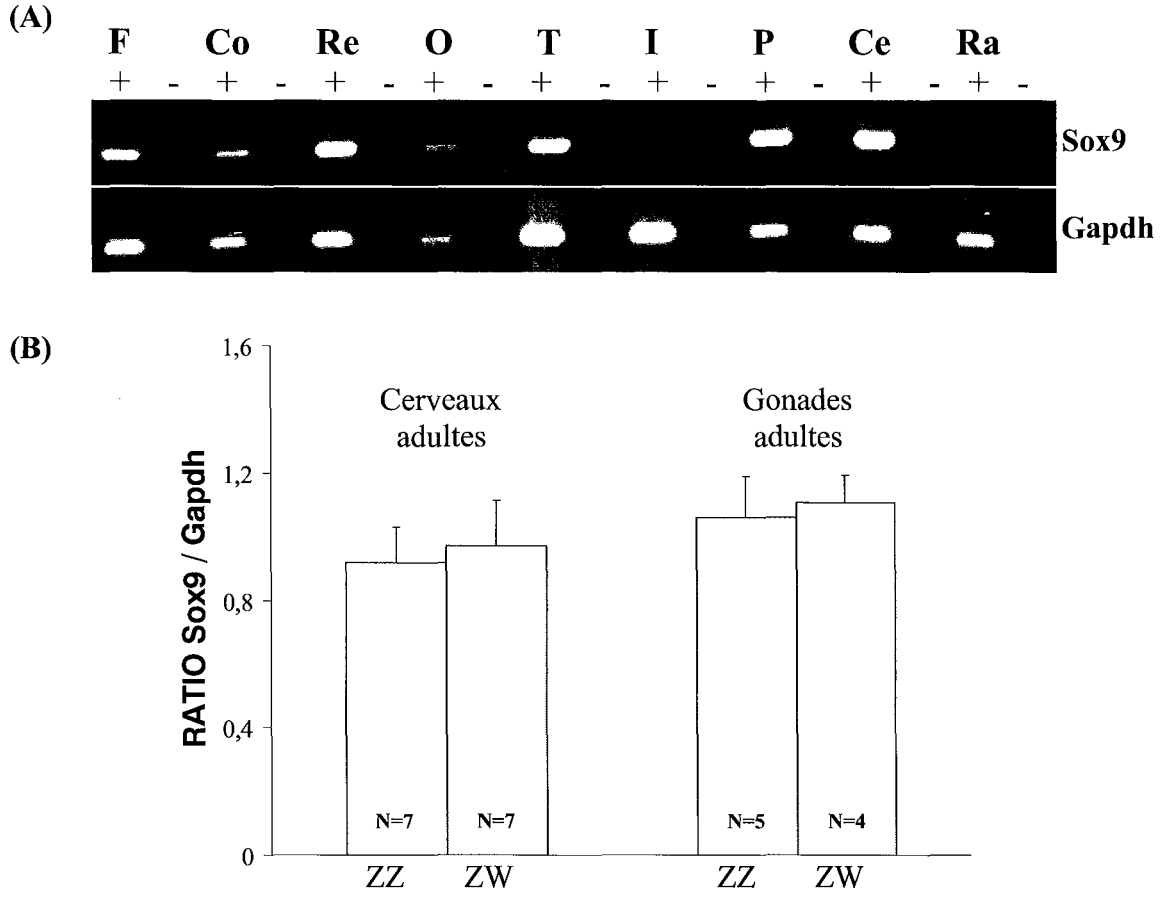



**Figure 30 : Expression de Sox9 dans différents tissus adultes.** (A) Les ARNs totaux ont été extraits à partir de différents tissus adultes : cerveau (Ce), cœur (Co), foie (F), intestin (I), rein (Re), poumon (P), testicule (T), ovaire (O), Rate (Ra) et amplifiés par RT-PCR qualitative (35 cycles). Pour chaque tissu, deux analyses avec (+) ou sans (-) réverse transcriptase ont été réalisées. La Gapdh sert de témoin positif. (B) Les ARNs totaux de cerveaux et de gonades de plusieurs individus mâles et femelles adultes ont été extraits, rétrotranscrits puis amplifiés par PCR semi-quantitative (26 cycles). Après hybridation, l'intensité du signal de Sox9 a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. L'écart-type moyen est présenté par une barre. Le nombre de répétitions est indiqué par N.

*c) Les transcrits Sox9 sont présents dans le cerveau au cours de la TSP*

Des têtes de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevées et extraites à différents stades de la période thermosensible : 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54. La rétrotranscription a été réalisée à partir de 3µg d'ARNs totaux et les ADNc ont ensuite été amplifiés par PCR qualitative (35 cycles). Après hybridation, nous avons détecté un signal dès le stade 42 chez les trois types de larves (Fig.31). Par la suite, l'expression est maintenue chez ces larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ pendant toute la période thermosensible.

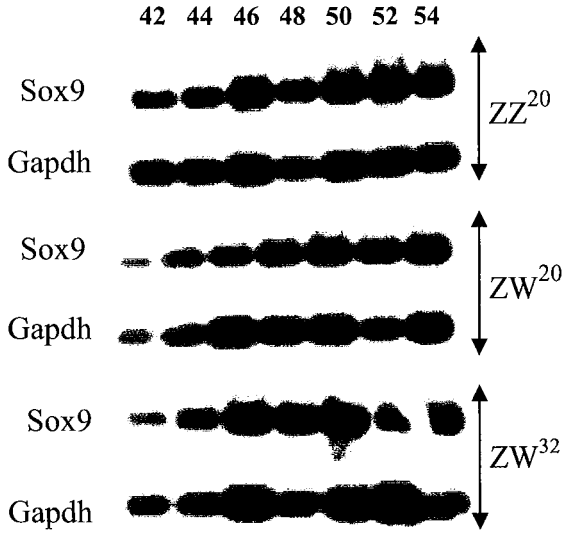



**Figure 31 : Expression de Sox9 au cours de la période thermosensible dans le cerveau de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$.** Les cerveaux de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés à différents stades du développement : 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54. Chaque échantillon est constitué d'un "pool" de 4 cerveaux dont les ARNs totaux ont été extraits, rétrotranscrits puis amplifiés par PCR qualitative (35 cycles). Après migration sur gel et transfert, la membrane a été hybridée avec une sonde spécifique de Sox9 et révélée en chimioluminescence. La Gapdh sert de témoin.

*d) Le messager Sox9 est détecté très tôt au cours de la TSP dans les complexes gonades-mésonéphros*

L'expression de Sox9 a aussi été étudiée dans les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ à différents stades de la période thermosensible : 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54. Pour chaque stade et chaque type de larves, les ARNs de «pools» de 5 complexes gonades-mésonéphros ont été extraits et analysés par RT-PCR qualitative (35 cycles). Les transcrits Sox9 sont aussi présents dès le stade 42 chez les larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$

et $ZW^{32}$. Cette expression est ensuite maintenue quels que soient le stade et le type de larve pendant toute la période thermosensible (Fig.32).

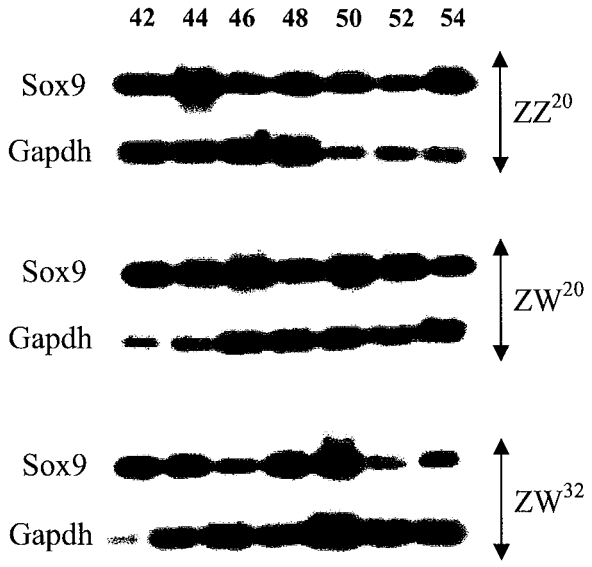


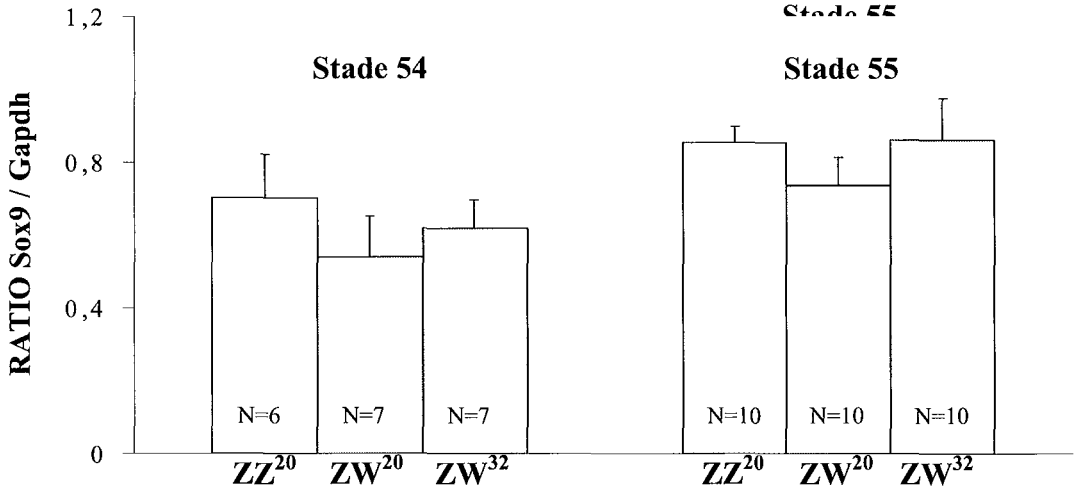

**Figure 32 : Expression de Sox9 au cours de la période thermosensible dans les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$.** Les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés à différents stades de la période thermosensible : 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54. Chaque échantillon est constitué d'un "pool" de 5 complexes gonades-mésonéphros dont les ARNs totaux ont amplifiés par RT-PCR qualitative (35 cycles). Après migration sur gel et transfert, la membrane a été hybridée avec une sonde spécifique de Sox9 et révélée en chimioluminescence. La Gapdh sert de témoin.

### *e) Le niveau des transcrits Sox9 augmente dans le complexe gonades-mésonéphros des larves ZZ après la métamorphose*

Une RT-PCR semi-quantitative (28 cycles) a été réalisée sur des complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ aux stades 54 et 55 (Fig.33A). Comme précédemment, chaque échantillon est constitué de 5 complexes gonades-mésonéphros. Les résultats ont révélé que le niveau des transcrits Sox9 est légèrement plus important chez les larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{32}$ par rapport aux larves $ZW^{20}$. Cependant, cette différence n'est significative ni au stade 54, ni au stade 55 entre les larves $ZW^{20}$ et $ZZ^{20}$ (P=0,3 et P=0,18) ou $ZW^{32}$ (P=0,54 et P=0,39). Par conséquent, nous avons réalisé la même étude sur des larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ à un stade plus tardif, le stade 56, situé après la métamorphose (Fig.33B). Pour cette analyse, chaque échantillon est constitué du complexe gonades-mésonéphros d'un seul animal. Après la RT-PCR semi-quantitative (28 cycles), nous avons observé une différence plus importante avec un ratio Sox9 / Gapdh 1,3 fois

supérieur chez les larves $ZZ^{20}$ par rapport aux larves $ZW^{20}$. Néanmoins, cette différence n'est toujours pas significative (P=0,055).

**(A)**




**(B)**

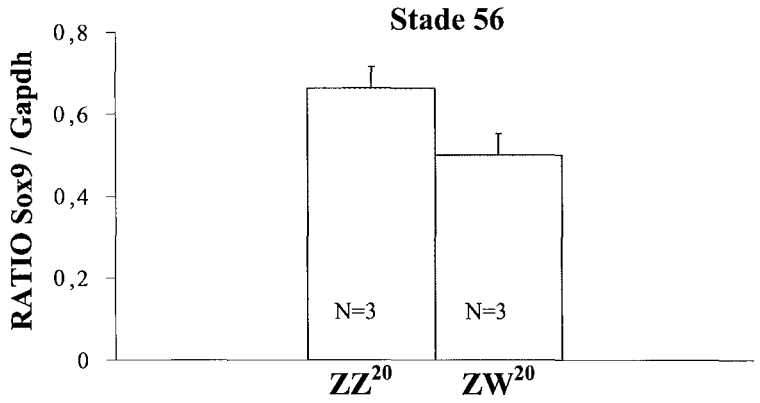



**Figure 33 : Quantification de l'expression de Sox9 dans les complexes gonades-mésonéphros chez des larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$, aux stades 54, 55 et 56.** (A) Les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés aux stades 54 et 55. Chaque échantillon est constitué d'un "pool" de 5 complexes gonades-mésonéphros dont les ARNs totaux ont analysés par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles). (B) les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ ont été prélevés après la métamorphose, au stade 56. Chaque échantillon ne comporte ici qu'un seul complexe. Les ARNs totaux (1 µg) ont été amplifiés par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles). Pour les deux analyses, après l'hybridation, l'intensité du signal Sox9 a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. La moyenne des rapports est présentée sur l'histogramme. L'écart-type moyen est présenté par une barre. Le nombre de répétitions est indiqué par N.

*f) Le niveau de transcrits Sox9 n'est pas significativement différent dans les gonades de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ au stade 55*

Les transcrits Sox9 sont présents à la fois dans le mésonéphros et les gonades (résultats non présentés), c'est la raison pour laquelle nous avons analysé des gonades séparées du mésonéphros au stade 55. Chaque échantillon est constitué de 5 gonades isolées qui ont été prélevées sur des larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ (Fig.34). Les résultats de nos analyses par RT-PCR semi-quantitative (26 cycles) montrent que le niveau de transcrits n'est toujours pas significativement différent entre les gonades de larves $ZZ^{20}$ et celles de larves $ZW^{20}$ (P=0,056). Toutefois, le ratio du niveau de transcrits Sox9 / Gapdh est 1.51 fois supérieur chez les larves mâles par rapport aux larves femelles.

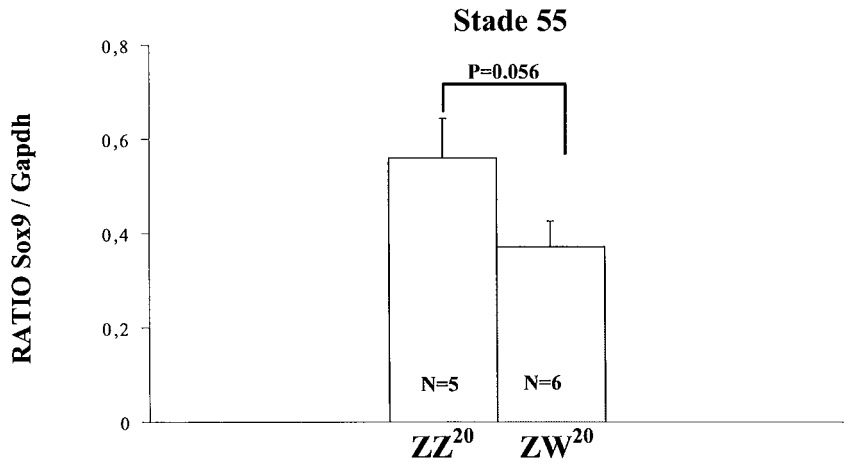



**Figure 34 : Quantification de l'expression de Sox9 dans des gonades isolées chez des larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ au stade 55.** Les gonades séparées du mésonéphros ont été prélevées sur des larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ au stade 55. Chaque échantillon est constitué d'un "pool" de 5 gonades dont les ARNs totaux ont été amplifiés par RT-PCR semi-quantitative (26 cycles). Après hybridation, l'intensité du signal Sox9 a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. L'écart-type moyen est présenté par une barre. Le nombre de répétitions est indiqué par N.

## D) Discussion

La plus grande partie de l'ADNc de Sox9 chez *Pleurodeles waltl* a été isolée par criblage d'une banque d'ADNc et par PCR. Malgré les nombreux essais de RACE-PCR, nous n'avons pas réussi à obtenir la partie manquante dans la région 5'. Bien que les différents clones obtenus par cette technique soient de taille attendue, l'analyse de la séquence est toujours correcte jusqu'au milieu de la boîte HMG puis devient incohérente,

avec de nombreux codons stop. Il est peu probable que ce soit une forme tronquée comme Sox9b chez la grenouille *Rana rugosa* (Takase M. *et al.*, 2000) puisque les séquences obtenues à partir des différents clones ne s'arrêtent jamais à la même place.

L'ADNc Sox9 comporte une région codante de 1131 pb avec une partie 3' non codante très longue de 1936 pb présentant une extrémité poly(A). Cette dernière région est également importante chez la tortue *Trachemys scripta* avec 1945 nucléotides (Spotila L.D. *et al.*, 1998) et chez l'homme avec 1939 pb (Foster J.W. *et al.*, 1994). L'ADNc partiel du pleurodèle code une protéine probable de 377 acides aminés. La comparaison de la séquence en acides aminés de différentes protéines Sox9 avec la séquence incomplète du pleurodèle montre une similarité importante. Trois régions conservées sont présentes dans la séquence partielle du pleurodèle. La boîte HMG, correspondant au domaine de liaison à l'ADN, présente une identité importante avec celle des autres espèces (de 91% à 93%) et comporte aussi 79 acides aminés. Le domaine de liaison à la protéine HSP70 présente un pourcentage d'identité de 52% à 73% et contient 106 acides aminés. Le domaine de transactivation dans la partie C-terminale de la protéine, le domaine PQS, riche en résidus proline, glutamine et serine est aussi très similaire (de 63% à 90%). Chez notre modèle, il est composé de 83 acides aminés comme chez l'homme, l'alligator et la grenouille mais il est plus court par rapport au poulet (84 acides aminés) et à la truite (87 acides aminés) (Sudbeck P. *et al.*, 1996; Kent J. *et al.*, 1996; Western P.S. *et al.*, 1999a; Takase M. *et al.*, 2000; Takamatsu N. *et al.*, 1997). Chez les mammifères, il existe un deuxième domaine de transactivation, le domaine PQA, riche en résidus proline, glutamine et alanine qui varie en longueur et en séquence entre les espèces (Sudbeck P. *et al.*, 1996; Ng L.J. *et al.*, 1997; Wagner T. *et al.*, 1994). Ce dernier est absent chez le pleurodèle comme chez le poulet, l'alligator, la grenouille et la truite. Chez le fugu, le motif PQA a été remplacé par une dizaine de glutamines (Bagheri-Fam S. *et al.*, 2001). Les signaux de localisation nucléaire nNLS et cNLS situés de part et d'autre de la boîte HMG et bien décrits chez les mammifères, semblent être bien conservés chez le pleurodèle sauf au début du nNLS (Sudbeck P. et Scherer G., 1997). Le signal d'export nucléaire NES (acides aminés 134-147), récemment étudié chez les mammifères est entièrement conservé entre les différentes espèces et le pleurodèle. Ce domaine est une courte région hydrophobe, riche en leucines et située au milieu de la boîte HMG (Gasca S. *et al.*, 2002).

Chez le pleurodèle, les transcrits Sox9 sont présents dans de nombreux tissus adultes : le foie, le cœur, le rein, l'ovaire, le testicule, le poumon et le cerveau. Cette large distribution a aussi été observée chez la truite avec des ARN messagers présents dans le

foie, le cœur comme chez le pleurodèle mais aussi dans l'estomac, la rate et la peau (Takamatsu N. *et al.*, 1997). C'est aussi le cas chez le poisson zèbre, où les transcrits de la forme Sox9a sont trouvés dans le rein, les muscles et les branchies (Chiang E.F. *et al.*, 2001a). Chez le wallaby, un faible niveau de transcrits Sox9 a été trouvé dans les poumons mâles et femelles adultes (Pask A.J. *et al.*, 2002). Contrairement au wallaby, le niveau des transcrits Sox9, chez le pleurodèle, est plus important dans le poumon par rapport aux gonades et au cerveau (résultats non présentés). Pour le moment, nous n'avons aucune explication concernant son rôle physiologique dans cet organe. Dans les gonades ainsi que dans le cerveau, le niveau de transcrits Sox9 n'est pas significativement différent quel que soit le sexe des individus. La présence de transcrits Sox9 dans le cerveau et le testicule a été décrite chez de nombreuses espèces : l'homme (Wagner T. *et al.*, 1994), la grenouille *Rana rugosa* (Takase M. *et al.*, 2000) la truite (Takamatsu N. *et al.*, 1997), le poisson zèbre (Chiang E.F. *et al.*, 2001a). Ceci est différent de la souris où Sox9 n'est exprimé que dans le testicule (Kent J. *et al.*, 1996) mais aussi du medaka où Sox9 est principalement détecté dans le cerveau et l'ovaire avec seulement un faible niveau de transcrits Sox9 détecté par RT-PCR dans le testicule (Yokoi H. *et al.*, 2002). De même chez le poisson zèbre, la forme dupliquée Sox9b présente une expression spécifique dans l'ovaire au niveau des ovocytes alors que les transcrits Sox9a ne sont pas détectés dans cet organe (Chiang E.F. *et al.*, 2001a). Une expression ovarienne a aussi été observée chez le pleurodèle et la truite (Takamatsu N. *et al.*, 1997), mais pas chez le poulet, la souris (Kent J. *et al.*, 1996) et la grenouille (Takase M. *et al.*, 2000).

Au cours du développement, chez le pleurodèle, les transcrits Sox9 sont détectés très tôt, dès le stade 42, dans le cerveau et les complexes gonades-mésonéphros des larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$. Ils sont ensuite présents à tous les stades ultérieurs analysés. Une expression de Sox9 a déjà été décrite dans les cerveaux d'embryons mâles et femelles chez la tortue *Trachemys scripta* (Spotila L.D. *et al.*, 1998) et chez le wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2002). Chez le poisson zèbre, le gène Sox9b semble intervenir au niveau du développement des crêtes neurales (Li M. *et al.*, 2002). Au cours de la différenciation gonadique, Sox9 est détecté très tôt dans les crêtes génitales de l'homme (Hanley N.A. *et al.*, 2000; De Santa Barbara P. *et al.*, 2000), de la souris (Kent J. *et al.*, 1996), du wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2002), du poulet (Morais da Silva S. *et al.*, 1996), des tortues *Trachemys scripta* (Spotila L.D. *et al.*, 1998) et *Lepidochelys olivacea* (Moreno-Mendoza N. *et al.*, 1999), de l'alligator (Western P.S. *et al.*, 1999a) et du lézard *Eublepharis macularius* (Valleley E.M. *et al.*, 2001). Chez toutes ces espèces, il a été démontré que Sox9 était par

la suite surexprimé chez les embryons mâles suggérant un rôle dans la différenciation testiculaire.

L'étude par RT-PCR semi-quantitative au cours de la différenciation gonadique chez le pleurodèle n'a révélé aucune différence significative entre les différentes larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ aux stades 54, 55 et 56. Néanmoins, après la métamorphose (stade 56), le niveau des transcrits Sox9 est plus important chez les larves $ZZ^{20}$. Le résultat se rapproche de ce qui a été observé chez la grenouille *Rana rugosa*, où Sox9 est exprimé dans les gonades mâles et femelles au cours du développement mais l'augmentation significative des transcrits Sox9 dans le testicule n'est observée que deux mois après la métamorphose (Takase M. *et al.*, 2000). Cependant, chez le pleurodèle, les analyses ont été réalisées sur des complexes gonades-mésonéphros alors que le mésonéphros exprime fortement Sox9 au cours de cette période (résultats non présentés), nous empêchant peut-être de détecter une différence significative plus tôt. Donc, l'étude a été recommencée au stade 55, stade auquel les gonades peuvent être séparées du mésonéphros. Nous avons observé que le ratio Sox9 / Gapdh est 1,51 fois plus important dans les gonades de larves $ZZ^{20}$ par rapport aux gonades de larves $ZW^{20}$ mais la différence d'expression n'est pas significative malgré cette "tendance" en faveur des mâles. Comme il est actuellement impossible de séparer la gonade du mésonéphros au stade 54, il est difficile de savoir si une expression sexuelle dimorphique a lieu plus tôt. Dans tous les cas, ce résultat se rapproche de ce qui a été observé chez le wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2002), les tortues *Trachemys scripta* (Spotila L.D. *et al.*, 1998) et *Lepidochelys olivacea* (Moreno-Mendoza N. *et al.*, 1999), l'alligator (Western P.S. *et al.*, 1999a). Contrairement à ces dernières espèces, l'expression de Sox9 disparaît de l'ovaire lorsque le niveau de transcrits augmente dans le testicule chez la souris, le poulet et le lézard *Eublepharis macularius*, (Kent J. *et al.*, 1996; Morais da Silva S. *et al.*, 1996; Valleley E.M. *et al.*, 2001).

Comme chez l'alligator et le lézard, l'expression de Sox9 a tendance à augmenter tardivement dans les gonades mâles chez le pleurodèle (Western P.S. *et al.*, 1999a; Valleley E.M. *et al.*, 2001). Au stade 55, les gonades sont déjà bien différenciées suggérant que Sox9 est un facteur de la différenciation testiculaire et non un déterminant sexuel comme chez la tortue *Lepidochelys olivacea* (Moreno-Mendoza N. *et al.*, 1999). Ainsi, Sox9 pourrait être impliqué dans l'organisation structurale du testicule comme chez l'alligator (Western P.S. *et al.*, 1999a) ou dans la spermatogénèse comme chez le rat (Frojdman K. *et al.*, 2000). Cependant, le niveau de transcrits Sox9 détecté dans les gonades femelles est encore important au stade 55. Comme chez l'homme et la souris, la

distribution cellulaire de Sox9 pourrait jouer un rôle important durant le processus de la détermination et différenciation mâle chez le pleurodèle. En effet, chez l'homme et la souris, la protéine SOX9 est localisée dans le cytoplasme des cellules somatiques dans les crêtes génitales mâles et femelles. Au moment de la différenciation testiculaire, SOX9 est relocalisé dans le noyau et induit l'expression de l'AMH alors qu'il reste cytoplasmique chez les femelles (De Santa Barbara P. *et al.*, 2000; Morais da Silva S. *et al.*, 1996). Les mutations au niveau des signaux d'import nucléaire (nNLS et cNLS) affectent l'activation des gènes impliqués dans la formation du cartilage et du testicule (Preiss S. *et al.*, 2001; Argentaro A. *et al.*, 2003). De plus, le blocage de l'export de SOX9 par substitution d'une leucine en alanine au niveau du signal d'export nucléaire (NES) entraîne l'inversion sexuelle de gonades XX en culture (Gasca S. *et al.*, 2002). Ainsi, chez les mammifères, un équilibre dans les systèmes d'import et d'export nucléaires joue un rôle important dans le contrôle de la différenciation sexuelle. Ainsi, chez notre modèle, il est possible que la protéine SOX9 soit cytoplasmique dans les gonades femelles et nucléaire dans les gonades mâles.

Ce travail a abouti à l'isolement d'un ADNc incomplet de Sox9 chez le pleurodèle. La comparaison de la séquence en acides aminés déduite du pleurodèle présente un haut degré d'identité avec celle des autres espèces et principalement au niveau des régions conservées. Les transcrits Sox9 sont présents dans de nombreux tissus adultes notamment le testicule, le cerveau et l'ovaire. Au cours du développement, Sox9 est détecté très tôt dans les complexes gonades-mésonéphros et les cerveaux de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$. L'analyse semi-quantitative n'a pu mettre en évidence aucune différence significative entre les larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$, même dans les gonades isolées au stade 55. Avant ce stade, les gonades sont difficilement dissociables du mésonéphros et les études réalisées sur les complexes gonades-mésonéphros n'ont peut-être pas donné de résultats différentiels en raison de la présence de transcrits Sox9 dans le mésonéphros.

Enfin, la température ne semble pas modifier l'expression de Sox9. Effectivement, bien que les larves $ZW^{32}$ présentent un niveau d'expression similaire à celui des larves $ZZ^{20}$, supérieur à celui des larves $ZW^{20}$, cela semble être la conséquence de la différenciation gonadique plutôt qu'un effet direct de la température puisque ces changements sont détectés tardivement. Les résultats sont différents chez la tortue *Lepidochelys olivacea*, où l'expression de Sox9 varie en fonction de la température d'incubation dans des cultures de gonades (Moreno-Mendoza N. *et al.*, 2001).

Toutefois, le domaine de liaison pour la protéine HSP70 qui est conservé chez le

pleurodèle pourrait être impliqué au cours de l'inversion sexuelle des larves ZW[32]. En effet, la protéine HSP70 est induite par la température puis reste à un niveau constant élevé au cours de la TSP chez les larves ZW (résultats non publiés). Ainsi, une interaction entre la protéine SOX9 et HSP70 pourrait participer à l'inhibition la différenciation femelle et/ou activer la différenciation mâle lors du chauffage à 32°C des larves ZW.

## 3) Recherche d'un gène impliqué dans la différenciation testiculaire chez *Pleurodeles waltl*

(non soumis)

### A) Introduction

DMRT1 est un facteur de transcription hautement conservé que l'on trouve chez toutes les classes de vertébrés. Il présente une similarité de séquence avec les protéines régulatrices de la différenciation du sexe DSX-M de la drosophile et MAB-3 du nématode *Caenorhabditis elegans* (Raymond C.S. *et al.*, 1998). Chez les vertébrés, DMRT1 joue aussi un rôle dans la différenciation sexuelle. En effet, DMRT1 est impliqué dans la différenciation testiculaire chez la souris (Raymond C.S. *et al.*, 1999b; De Grandi A. *et al.*, 2000), le poulet (Smith C.A. *et al.*, 1999b), la tortue Trache*mys scripta* (Kettlewell J.R. *et al.*, 2000), le lézard *Calotes versicolor* (Sreenivasulu K. *et al.*, 2002), la grenouille *Rana rugosa* (Shibata K. *et al.*, 2002) et les poissons *Oncorhynchus mykiss* et *Oreochromis niloticus* (Marchand O. *et al.*, 2000; Guan G. *et al.*, 2000). Chez certaines de ces espèces, il intervient dans la détermination sexuelle comme chez le medaka, où un homologue de DMRT1, DMY, a été recruté comme déterminant testiculaire (Matsuda M. *et al.*, 2002). Chez le poulet, la localisation de Dmrt1 sur le chromosome Z ainsi que le niveau de transcrits Dmrt1 plus important dans les gonades ZZ par rapport aux gonades ZW lui suggèrent un rôle dans la détermination mâle (Nanda I. *et al.*, 1999). De même, chez la tortue *Trachemys scripta*, l'augmentation du niveau de transcrits Dmrt1 à température masculinisante est détectée très tôt au cours du développement (Murdock C. et Wibbels T., 2003a). Chez cette dernière et une autre tortue *Lepidochelys olivacea* ainsi que chez l'alligator, l'expression de Sox9 dans les embryons mâles est précédée par celle de Dmrt1 suggérant que ce dernier joue un rôle clé dans la détermination sexuelle mâle chez les reptiles TSD (Smith C.A. *et al.*, 1999b; Torres Maldonado L.C. *et al.*, 2002; Kettlewell J.R. *et al.*, 2000; Murdock C. et Wibbels T., 2003a). Chez l'homme, les transcrits Dmrt1 sont détectés en même temps que les transcrits SRY dans les crêtes génitales mâles alors qu'ils sont absents chez les femelles (Moniot B. *et al.*, 2000). Cependant, Dmrt1 semble plutôt jouer un rôle essentiel dans la différenciation testiculaire chez les mammifères au regard du phénotype des patients présentant une délétion d'une partie du chromosome 9 contenant Dmrt1 et de celui des souris knock-out Dmrt1$^{-/-}$ (Raymond C.S. *et al.*, 2000; Raymond C.S. *et al.*, 1999a). Afin d'établir une éventuelle intervention de Dmrt1 au cours de la cascade génique de la détermination et différenciation sexuelle chez *Pleurodeles*

*waltl*, nous avons isolé ce gène et analysé son profil d'expression au cours du développement.

## B) Matériel et Méthodes

### *a) Animaux*

Les pleurodèles adultes sont élevés dans l'eau courante à 20±2°C dans notre laboratoire. Un lot de larves témoins élevées dans ces conditions présente une différenciation gonadique conforme au génotype sexuel ($ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$). Des larves ZW ont été élevées à 32°C pendant toute la période thermosensible du stade 42 au stade 54 ($ZW^{32}$), conditions où une inversion complète est obtenue. Les animaux WW sont obtenus en croisant une femelle standard ZW et un mâle ZW résultant d'une inversion de larves ZW par la température : le quart de la descendance présente le génotype WW caractérisant les femelles thélygènes.

Avant la dissection, les animaux sont anesthésiés dans une solution de benzocaïne (0,03%). Chez les animaux adultes, différents organes ont été prélevés : cerveau, cœur, foie, rein, rate, testicule, ovaire, intestin et les poumons. Chez les larves, à cause de la petite taille des gonades, les études ont été réalisées sur le complexe gonades-mésonéphros. En effet, les gonades sont difficilement dissociables du mésonéphros avant le stade 55.

### *b) Clonage du gène Dmrt1*

Les ARNs totaux d'un testicule adulte (1 µg) ont été rétrotranscrits en utilisant des oligonucléotides ($dT_{15}$) et la transcriptase inverse Superscript II MMLV (Invitrogen), puis amplifiés par PCR dégénérée à l'aide des amorces Dmrt1-up 5'-GAYTGYCARTGYAARAAR-3' et Dmrt1-dw 5'-TTCATYTGCCAYTGYTTNCC-3' (Fig.35). L'amplification a été réalisée avec 0,1 unité de Taq polymérase dans un tampon contenant 25 mM de chaque dNTP et 3,5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen). Le programme PCR commence par 1 cycle de 3 minutes à 94°C, il est suivi par les 20 cycles comportant : 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation à 60°C et 1 minute d'élongation à 72°C. Au cours de ces 20 cycles, la température d'hybridation est progressivement diminuée de 60°C à 40°C. Enfin, l'amplification est poursuivie pendant encore 30 cycles à une température d'hybridation de 40°C. Le produit de PCR obtenu, long de 540 pb a été cloné dans le plasmide pGEM-T easy et séquencé (Genome Express).

La technique de RACE-PCR (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech) a été utilisée afin d'amplifier les parties 5' et 3' manquantes du gène Dmrt1. Pour ce faire, 1µg d'ARNs totaux de testicule adulte a été rétrotranscrit puis amplifié à l'aide de deux amorces spécifiques DMRT1-5R 5'-CGTGTTCTCCAGGTGCCCTCTGCTGCT-3' et DMRT1-3R 5'-CCACTACAGCATCAGAGGGTCGTGTGC-3' en présence d'une unité de Taq polymérase (Advantage 2 Polymerase Mix, Clontech). Le programme PCR utilisé pour chaque amplification en 5' et 3' est le suivant :

**94°C 3 minutes**
**94°C 30 secondes**
**72°C 3 minutes** } 5 cycles
**94°C 30 secondes**
**70°C 30 secondes**
**72°C 3 minutes** } 5 cycles
**94°C 30 secondes**
**68°C 30 secondes**
**72°C 3 minutes** } 30 cycles

Deux fragments de 700 pb et de 1,2 kb ont été isolés à partir des deux RACE-PCR en 5' et 3' respectivement. Ces derniers ont été clonés dans le plasmide pGEM-T easy et séquencés (Genome Express).

*c) Analyse par RT-PCR*

Le protocole détaillé a déjà été décrit précédemment (voir partie résultats I.1). Lors de cette étude, des «pools» de 5 complexes gonades-mésonéphros ont été constitués pour les larves. En ce qui concerne les tissus adultes, un fragment de chaque organe a été prélevé. Les ARNs des différents échantillons ont ensuite été extraits grâce à la technique au TRIzol (Invitrogen).

La rétrotranscription (RT) a été réalisée à partir de quantités différentes d'ARNs totaux : 3µg pour les tissus adultes et 1µg pour le complexe gonades-mésonéphros. Lors de cette réaction, des amorces aléatoires et 100 unités de transcriptase inverse MMLV (Invitrogen) ont été utilisés dans un volume total de 25 µl. Ensuite un aliquot de 2µl d'ADNc a été amplifié avec 0,1 unité de Taq Polymérase (Invitrogen) dans un tampon contenant 25 mM

de chaque dNTP, 2 mM $MgCl_2$ et 0,4 pM de chaque amorce dans un volume total de 25 µl. Différents couples d'amorces spécifiques ont été utilisés pour Dmrt1 (Fig.35) :

Dmrt1-1 : D1 5'-AGCCTGATCGCCGAGCGCCAG-3'
Dmrt1-2 : D2 5'-CACTGCCACCTGGTACTGCGG-3'
Dmrt1-5 : D5 5'-CCTTCCATCAGCAGCAGAGGG-3'
Dmrt1-6 : D6 5'-CTGATTTCCCGACTGCCCGGA-3'
Dmrt1-7 : D7 5'-GTCATGCTCTGGAGTGCTCCC-3'
Dmrt1-9 : D9 5'-GTACGAGGCTGCCGCAGGGTA-3'

| Couples d'amorces utilisées | T°C hybridation | Taille du fragment |
|---|---|---|
| D1-D2 | 62°C | 393 pb |
| D1-D7 | 58°C | 570 pb |
| D5-D6 | 58°C | 252 pb |
| D1-D9 | 58°C | 614 pb |
| D1-D6 | 58°C | 533 pb |

Afin de vérifier la qualité des ADNc produits, la Gapdh a été utilisée comme témoin de PCR (amorces 5'- ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3' et 5'- CCGGTATTGCA CTCAACGACC-3' conduisant à un fragment de 290 pb) et amplifiée pendant 24 cycles (1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation à 52°C et 1 minute d'élongation à 72°C). Pour le gène Dmrt1, les conditions de PCR utilisées sont : 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation et 2 minutes d'élongation à 72°C. La PCR est poursuivie pendant 35 cycles pour les analyses qualitatives et 28 cycles pour les analyses semi-quantitatives.

Les produits obtenus (10µl) ont été déposés sur un gel d'agarose à 1% et observés sur gel ou transférés sur une membrane de Nylon (Hybond-N, Amersham) avant d'être hybridés avec des sondes marquées et détectés par chimioluminescence selon les conditions décrites précédemment (voir partie résultats I.1). L'intensité du signal a été mesurée par l'utilisation du GelDoc 2000 puis quantifiée grâce au logiciel "Quantity One" (Bio-rad). Les quantités relatives de transcrits Dmrt1 sont normalisées par rapport au témoin Gapdh.

*d) Extraction et PCR sur ADN génomique*

Les gonades ont été prélevées sur un pleurodèle adulte et broyées dans un tampon (Tris-HCl pH 8,0 10 mM, NaCl 75 mM, EDTA 25 mM) à l'aide d'un Potter. Cet homogénat est additionné de SDS (0,5%) et de protéinase K (0,2 mg/ml), puis il est incubé pendant 16 heures à 37°C sous agitation douce. Une série d'extractions au phénol permet l'élimination complète des pigments. Après extraction au chloroforme, l'ADN génomique est précipité avec de l'acétate de sodium 0,3 M et 1 volume d'isopropanol. La pelote d'ADN se formant est récupérée manuellement, puis lavée dans de l'éthanol à 70%, séchée et redissoute dans du TE pH 8,0 sous agitation douce pendant 16 heures à 4°C. Après dosage, 2 µg d'ADN génomique de larves ZZ, ZW et WW ont été amplifiés à l'aide des amorces D5-D6 choisies spécifiquement sur le même exon. Les conditions de PCR sont les mêmes que pour les autres couples d'amorces mais l'amplification est réalisée pendant 35 cycles à 58°C. Les produits de PCR ont été déposés et analysés directement sur gel.

*e) Analyses statistiques*

Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes décrivant la moyenne des rapport Dmrt1 / Gapdh. L'écart-type moyen de chaque expérience est indiqué par une barre. Les variations d'expression entre les différents groupes ont été analysées par un test de Student.

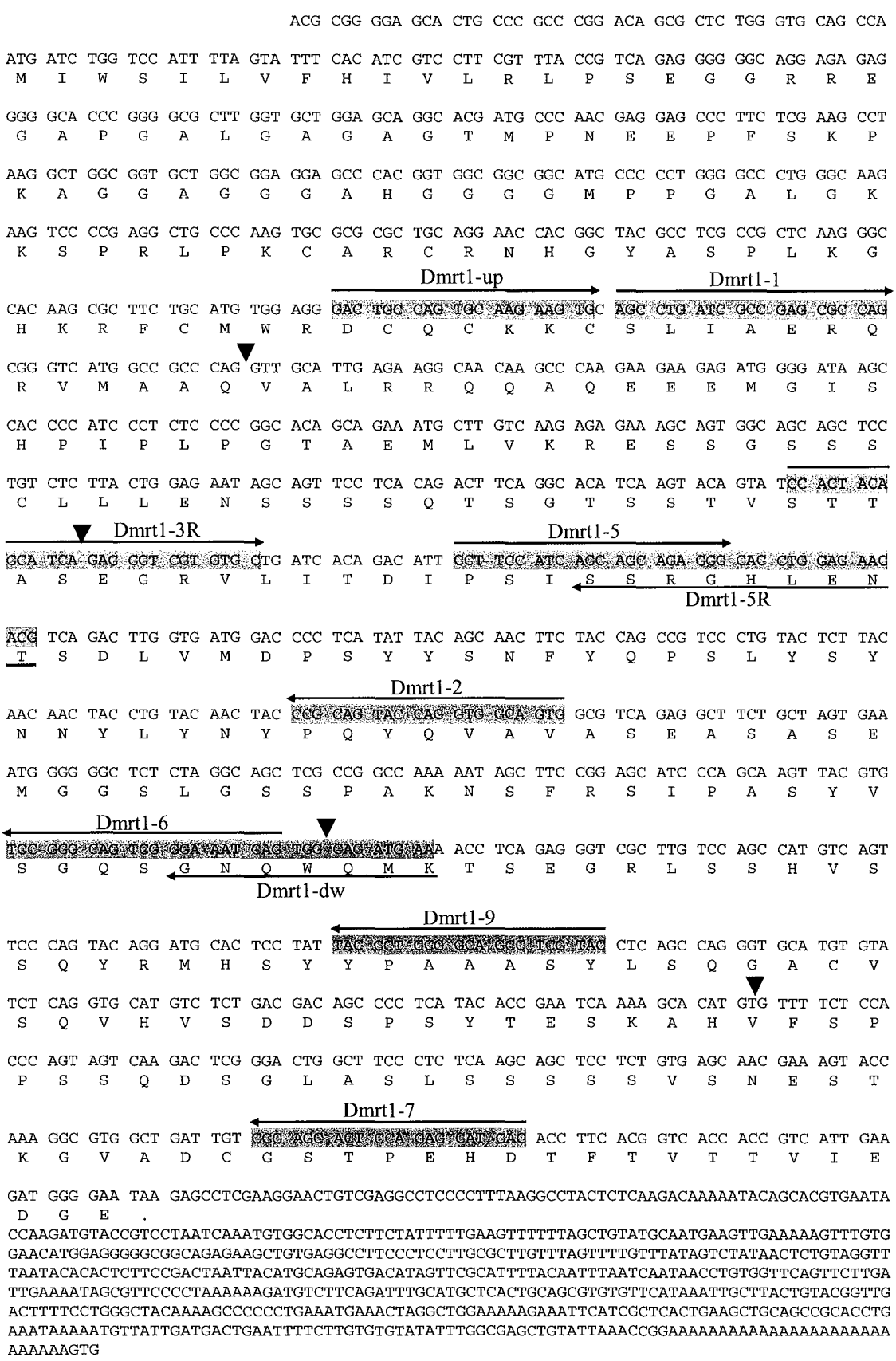



**Figure 35 : Séquence de l'ADNc de Dmrt1 de *Pleurodeles waltl*.** Les oligonucléotides utilisés en PCR sont surlignés et leur orientation est indiquée par une flèche. La position des introns, déterminée d'après la comparaison des séquences de Dmrt1 de plusieurs espèces, est notée par une tête de flèche.

C) Résultats

*a) Clonage de l'ADNc de Dmrt1*

L'ADNc complet Dmrt1 a été isolé chez *Pleurodeles waltl* à partir d'ARNs totaux de testicule adulte (Fig.35). Un premier fragment de 540 pb, situé au milieu de la région codante, a été obtenu par PCR dégénérée. Afin de compléter chaque extrémité de l'ADNc de Dmrt1, deux amorces spécifiques ont été choisies et utilisées en RACE-PCR. Deux fragments de 700 pb et de 1,2 kb ont été amplifiés par RACE-PCR en 5' et 3' respectivement.

L'ADNc Dmrt1 contient une région codante présumée de 1131 pb. Les régions 5' et 3' non traduites ont une taille de 45 pb et 605 pb respectivement. La protéine déduite comporte 377 acides aminés; elle est donc légèrement plus longue que celles de la souris (374 acides aminés) et de l'homme (373 acides aminés). La séquence en acides aminés ainsi déduite a été comparée à celle d'autres espèces : l'homme, la souris, le poulet et la tortue *Trachemys scripta* (Fig.36). Bien que la séquence de la tortue *Trachemys scripta* soit incomplète, la protéine DMRT1 du pleurodèle présente la plus haute identité (67%) de séquence avec cette dernière. L'identité de séquence est seulement de 65% avec le poulet, 60% avec la souris et de 58% avec l'homme. Néanmoins, le pourcentage d'identité est plus important au niveau des deux régions conservées de la protéine DMRT1. Le domaine DM de liaison à l'ADN (acides aminés 70-135) situé du côté N-terminal présente un haut degré d'identité de séquence entre les différentes espèces de 97% à 100%. Il en est de même pour le domaine P/S (acides aminés 317-351) du côté C-terminal avec 76% à 88% d'identité.

```
Pleurodèle --MIWSILVFHIVLRLPSEGGRREGAPGALGAGAGTMPNEEPFSKPKAGGAGGGAHGG
Trachemys  ------------------------------------------------------------
Poulet     ------------------------------------------------------------
Souris     MPNDDTFGKPSTPTEVPHAPGAPPKGKAGGYSKAAGAMAGAAGGSGAGGS--GGASGS
Homme      MPNDEAFSKPSTPSEAPHAPGVPPQGRAGGFGKASGALVGAASGSSAGGSSRGGGSGS

Pleurodèle GGMPPGALGKKSP RLPKCARCRNHGYASPLKGHKRFCMWRDCQCKKCSLIAERQRVM
Trachemys  ------------ ------------------------------------------
Poulet     -----PAAGKKLP RLPKCARCRNHGYSSPLKGHKRFCMWRDCQCKKCSLIAERQRVM
Souris     GPSGLGSGSKKSP RLPKCARCRNHGYASPLKGHKRFCMWRDCQCKKCSLIAERQRVM
Homme      GASDLGAGSKKSP RLPKCARCRNHGYASPLKGHKRFCMWRDCQCKKCNLIAERQRVM

                                                    DOMAINE DM

Pleurodèle AAQVALRRQQAQEEEMGISHP IPLPGTAEMLVKRESSGSSSCLLLENSSSSQTSGTS
Trachemys  ---------QAQEEELGISHP IPLPSAPELFVKKENNGGSSCLLLESSSPTHSTNTA
Poulet     AVQVALRRQQAQEEELGISHP VPLPSAPEPVVKKSSSSSSCLLQDSSSPAHSTSTVA
Souris     AAQVALRRQQAQEEELGISHP IPLPSAAELLVKRENNASNPCLMAENSSSAQPP-PA
Homme      AAQVALRRQQAQEEELGISHP IPLPSAAELLVKRENNGSNPCLMTECSGTSQPP-PA

Pleurodèle STVSTTASEGRVLITDIPSISSRGHLENTSDLVMDPSYYSNFYQPSLYSYNNYLYNYP
Trachemys  TTASTTPSEGRMLIQDIPSITSRGHLESTSDLVVDSTYYSSFYQPSLYPYYNNLYNYS
Poulet     AAAASAPPEGRMLIQDIPSIPSRGHLESTSDLVVDSTYYSSFYQPSLYPYYNNLYNYS
Souris     STPTPAASEGRMVIQDIPAVTSRGHMENTSDLVSDPAYYSSFYQPSLFPYYNNLYNYP
Homme      SVPTTAASEGRMVIQDIPAVTSRGHVENTPDLVSDSTYYSSFYQPSLFPYYNNLYNCP

Pleurodèle QYQVAVASEASASEMGGSLGSSPAKNSFRSIPASYVSGQSGNQWQMKTSEGRLSSHVS
Trachemys  QYQMAVASDSSSSDMGGTLVGSPVKNSLRSLPATYMSSQSGNQWQMKSTESRHA--MS
Poulet     QYQMAVATESSSSETGGTFVGSAMKNSLRSLPATYMSSQSGKQWQMKGMENRHA--MS
Souris     QYSMALSAESSSGEVGNSLGGSPVKNSLRSLPAPYVPAQTGNQWQMKTSESRHP--VS
Homme      QYSMALAADSASGEVGNPLGGSPVKNSLRGLPGPYVPGQTGNQWQMKNMENRHA--MS

Pleurodèle SQYRMHSYYPAAASYLSQGA----CVSQVHVSDDS PSYTESKAHVFSPPSSQDSGLA
Trachemys  SQYRMHSYYPPA-SYLGQSVSTPACVPQIFTFEDR PSYSGSKASVFSPPSSQDSGLI
Poulet     SQYRMCSYYPPT-SYLGQGVGSPTCVTQILASEDT PSYSESKARVFSPPSSQDSGLG
Souris     SQYRMHSYYGPP-SYLGQSMS------QIFTFEEG PSYSEAKASVFSPPSSQDSGLV
Homme      SQYRMHSYYPPP-SYLGQSVP------QFFTFEDA PSYPEARASVFSPPSSQDSGLV

                                                Domaine P/S riche

Pleurodèle SLSSSSSVSNES TKGVADCGSTP-EHDTFTVTTVIEDGE--      100% identité
Trachemys  SLSSSSPISNES TKGVLECESAS-ESGTFTVNSVIEDGE--       67% identité
Poulet     CLSSS-----ES TKGDLECEPHQ-EPGAFAVSPVLEGE---       65% identité
Souris     SLSSSSPMSNES SKGVLECESASSEPSSYAVNQVLEEDEDE       60% identité
Homme      SLSSSSPISNKS TKAVLECEPAS-EPSSFTVTPVIEEDE--       58% identité
```

**Figure 36 : Alignement de la séquence peptidique de DMRT1 de *Pleurodeles waltl* avec celles de la tortue *Trachemys scripta*, du poulet, de l'homme et de la souris.** Les acides aminés conservés avec ceux du Pleurodèle sont figurés en grisé. Les deux régions conservées : le domaine DM de liaison à l'ADN et la région P/S riche en proline / sérine sont encadrés.

*b) Dmrt1 semble être autosomal chez Pleurodeles waltl*

Nous avons amplifié l'ADN génomique de pleurodèles adultes par PCR à l'aide d'un couple d'amorces, D5-D6 situé sur le même exon. Nous avons détecté la présence d'un transcrit de taille attendue chez les trois types d'individus analysés ZZ, ZW et WW, suggérant que le gène Dmrt1 n'est pas porté par les chromosomes sexuels (Fig.37).

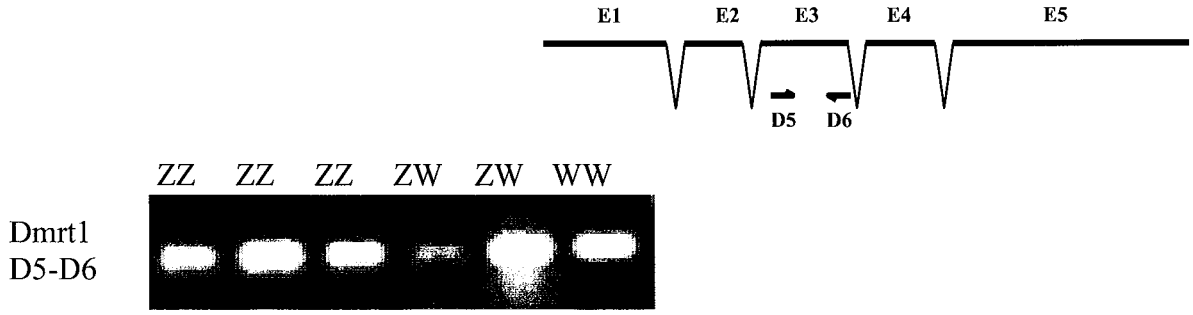



**Figure 37 : Amplification de l'ADN génomique de pleurodèles ZZ, ZW et WW adultes.** L'ADN génomique de 3 individus ZZ différents, de 2 individus ZW et d'une femelle WW a été amplifié par PCR à l'aide du couple d'amorces D5-D6 localisé sur l'exon 3 (E3) (représenté sur le schéma en haut à droite). Les produits de PCR ont été déposés puis analysés sur un gel d'agarose à 1%.

*c) Dmrt1 est exprimé spécifiquement dans le testicule des animaux adultes*

L'expression du gène Dmrt1 a été étudiée dans différents tissus adultes par la technique de RT-PCR qualitative réalisée avec le couple d'amorce D1-D2. Après migration sur gel, un signal est détecté uniquement au niveau du testicule (Fig.38).

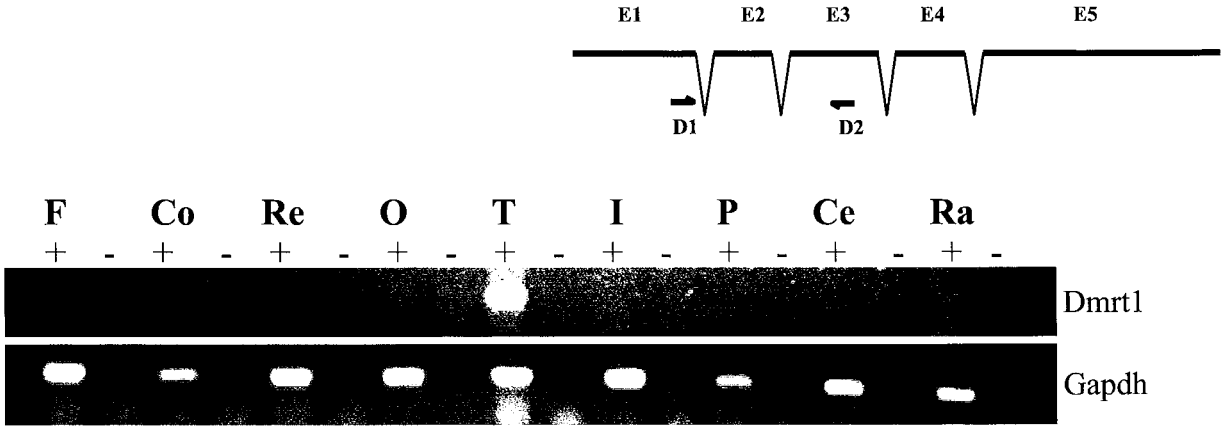



**Figure 38: Expression de Dmrt1 dans différents tissus adultes chez *Pleurodeles waltl*.** 3µg d'ARNs totaux ont été extraits à partir des tissus suivants : cerveau (Ce), cœur (Co), foie (F), intestin (I), rein (Re), poumon (P), testicule (T), ovaire (O), Rate (Ra). Ils ont été amplifiés par RT-PCR qualitative (35 cycles) à l'aide du couple D1-D2 (représenté sur le schéma en haut à droite). Pour chaque tissu, deux analyses avec (+) ou sans (-) transcriptase inverse ont été réalisées. La Gapdh sert de témoin.

*d) Dmrt1 est exprimé très tôt au cours du développement, indépendamment du sexe génétique*

La présence de transcrits Dmrt1 a été étudiée au cours du développement à différents stades : 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 55. Pour ce faire, les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés à chaque stade et rassemblés par lot de 5 complexes. Aucun transcrit n'a été détecté dans le mésonéphros seul (résultats non présentés). Les ARNs totaux correspondants (1 µg) ont été rétrotranscrits et amplifiés avec le couple d'amorces D1-D2. L'analyse qualitative (35 cycles) a révélé la présence de transcrits Dmrt1 dès le stade 42 chez les trois types de larves. Cette expression est ensuite maintenue quels que soient le stade et le type de larve (Fig.39).

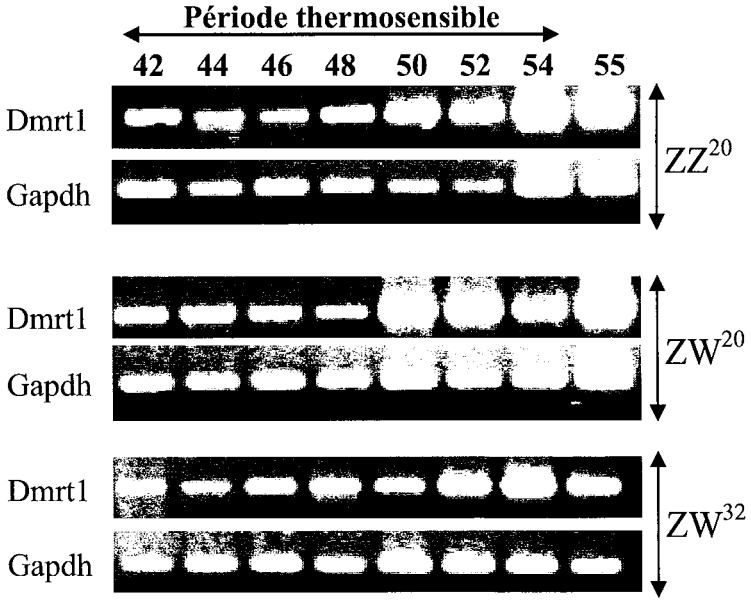



**Figure 39 : Expression de Dmrt1 au cours du développement.** Les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés à différents stades du développement : 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 55 puis analysés par RT-PCR qualitative (35 cycles) avec le couple D1-D2. Les produits de PCR ont ensuite directement été observés sur un gel d'agarose à 1%. La Gapdh sert de témoin positif.

*e) Dmrt1 est significativement plus exprimé chez les larves ZW au stade 55*

Une RT-PCR semi-quantitative (28 cycles) a été réalisée avec le couple d'amorces D1-D2 sur des complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ prélevés aux stades 54 et 55. Comme précédemment, pour chaque échantillon, des «pools» de 5 complexes gonades-mésonéphros ont été constitués. Après hybridation, aucune différence

significative n'a été détectée dans le niveau de transcrits Dmrt1 entre les larves $ZW^{20}$ et $ZZ^{20}$ (P=0,63) ou $ZW^{32}$ (P=0,73) au stade 54 (Fig.40). Au stade 55, au moment où la différenciation gonadique est bien amorcée, le niveau des transcrits augmente significativement chez les larves $ZW^{20}$ par rapport aux larves $ZZ^{20}$ (P=0,003) ou $ZW^{32}$ (P=0,014). Chez ces derniers, le niveau de transcrits est réduit à un niveau qui n'est pas significativement différent des larves $ZZ^{20}$ (P=0,26). Le ratio Dmrt1 / Gapdh est 1,88 fois supérieur chez les larves $ZW^{20}$ par rapport à celui détecté chez les larves $ZZ^{20}$ au stade 55.

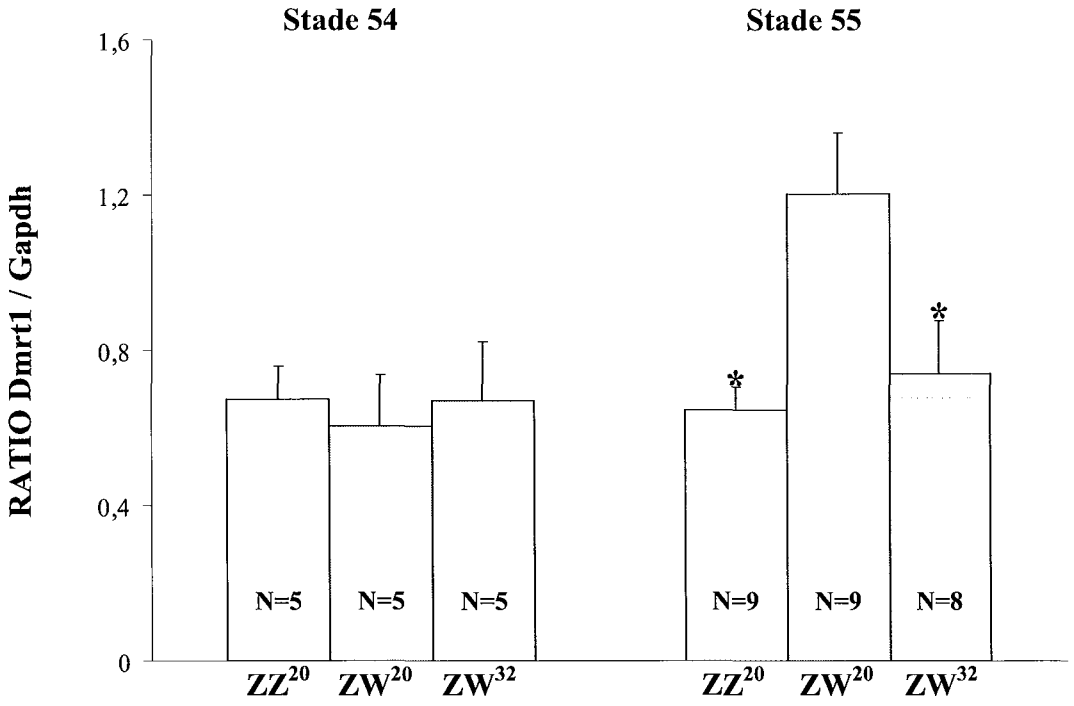



**Figure 40 : Quantification de l'expression de Dmrt1 dans les complexes gonades-mésonéphros chez des larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ au cours de la différenciation gonadique.** Les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés aux stades 54 et 55. Chaque échantillon est constitué d'un "pool" de 5 complexes gonades-mésonéphros dont les ARNs totaux ont été amplifiés par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles) avec le couple D1-D2. Après hybridation, l'intensité du signal Dmrt1 a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. L'écart-type moyen est indiqué par une barre. Le nombre de répétitions est indiqué par N. *, P<0,05 *vs.* $ZW^{20}$.

### *f) Dmrt1 fait l'objet d'un épissage alternatif*

Afin de confirmer le résultat précédent, d'autres couples d'amorces ont été testés par RT-PCR qualitative (35 cycles). En utilisant le couple D1-D7, nous avons observé des bandes de tailles différentes sur gel d'agarose. Ces dernières sont révélées après une

hybridation avec une sonde spécifique de Dmrt1 située entre les amorces D1 et D2 (Fig.41A). Le séquençage de ces différents fragments a révélé un épissage alternatif du messager Dmrt1. Le premier transcrit de 786 b correspond à l'ARNm complet, le deuxième de 600 b ne contient plus l'exon 2 et le dernier de 504 b ne possède pas l'exon 3 (Fig.41B). La séquence en acides aminés déduite de ces deux derniers transcrits présente de nombreux stops, quelle que soit la phase de lecture, indiquant que ces transcrits alternatifs codent une protéine tronquée. L'utilisation d'autres couples d'amorces comme D1-D6 ou D1-D9 conduit aussi à la production de fragments de PCR correspondant à la perte des exons 2 ou 3 respectivement (résultats non présentés).

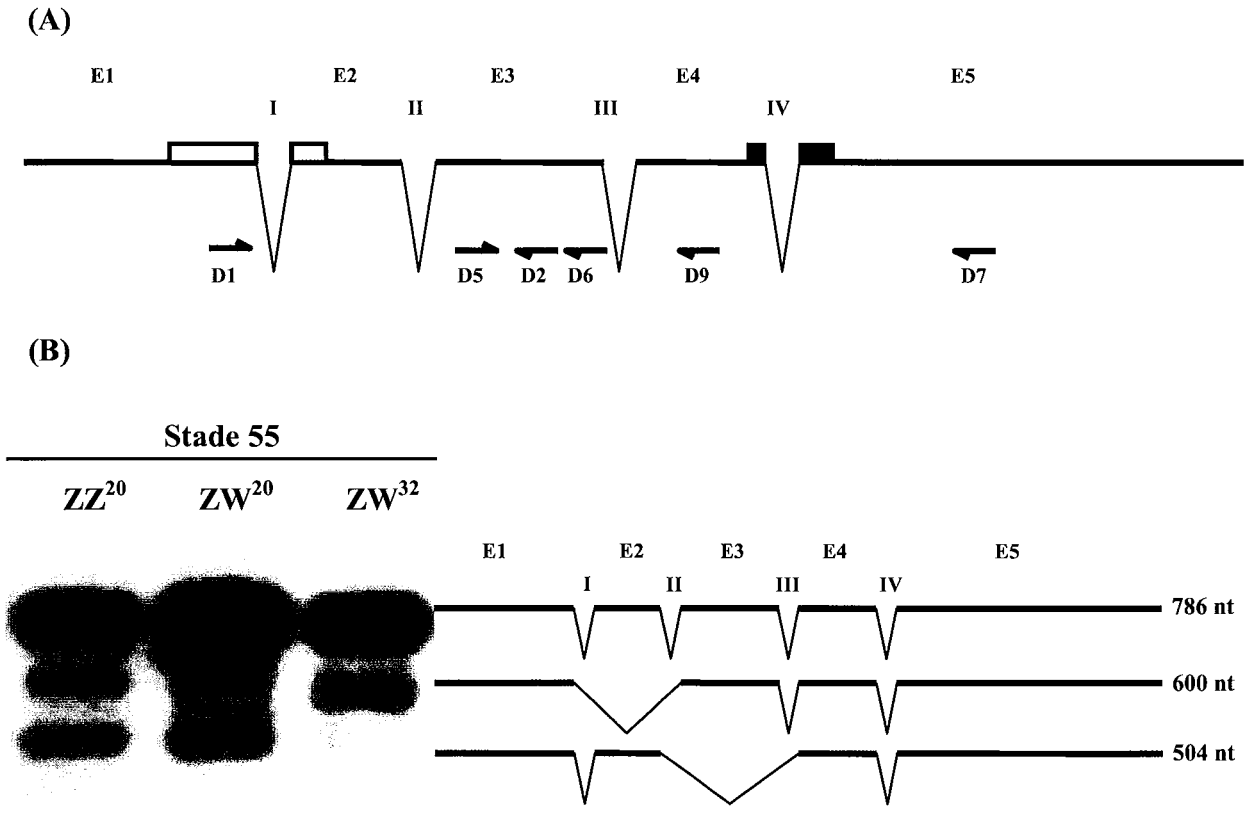
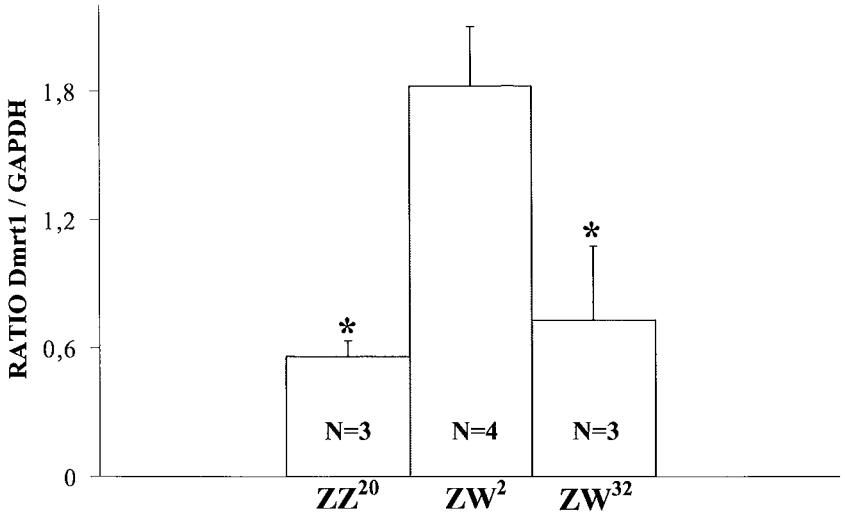



**Figure 41 : Analyse des différents transcrits alternatifs de Dmrt1.** (A) Schéma représentant la structure du gène Dmrt1 avec la position des différents introns (I à IV) et des exons (E1 à E5). Les différentes amorces D1, D6, D7 et D9 utilisées sont représentées par une demi flèche. Le cadre blanc correspond au domaine DM et le cadre noir au domaine P/S. (B) Les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés au stade 55. Chaque échantillon est constitué d'un "pool" de 5 complexes gonades-mésonéphros. Une RT-PCR qualitative (35 cycles) a été réalisée avec le couple D1-D7. Après migration sur gel et transfert, la membrane a été hybridée avec une sonde spécifique de DMRT1. En face de chaque bande, un schéma de l'événement d'épissage alternatif est représenté, conduisant aux messagers de 600 nt et 504 nt par élimination de l'exon 2 ou de l'exon 3 respectivement.

Le couple d'amorces D1-D7 a ensuite été utilisé pour une analyse par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles) sur des larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ afin de déterminer si ces différents transcrits varient en fonction du sexe et du traitement. Cette étude a été effectuée au stade 55, afin de confirmer l'expression différentielle observée avec le couple D1-D2. Après hybridation, nous n'avons pas observé de variations différentielles des deux transcrits épissés alternativement. Cependant, le fragment PCR correspondant à l'ARNm complet présente un taux significativement plus fort chez les larves $ZW^{20}$ que chez les larves $ZZ^{20}$ (P=0,007) ou les larves $ZW^{32}$ (P=0,03) (Fig.42A). Le niveau de transcrits Dmrt1 des larves $ZW^{32}$ n'est pas significativement différent de celui des larves $ZZ^{20}$ (P=0,58). Par conséquent, l'augmentation de l'expression de Dmrt1 au cours de la différenciation femelle, précédemment observé avec le couple d'amorces D1-D2, a pu encore être démontrée grâce à l'utilisation de ce nouveau couple d'amorces.

Afin de définir si le niveau de Dmrt1 est toujours aussi important chez les larves $ZW^{20}$, la même analyse par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles) a été réalisée avec les deux couples d'amorces D1-D2 et D1-D7 sur des complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ au stade 56 (Fig.42B). Comme à ce stade, la gonade est bien développée, nous n'avons utilisé qu'un seul animal par échantillon. Les résultats obtenus avec les deux couples d'amorces sont similaires et comme au stade 55, le niveau de transcrits est significativement plus élevé chez les larves $ZW^{20}$ par rapport aux larves $ZZ^{20}$ avec le couple D1-D2 (P=0,016) et D1-D7 (P=0,001). Le niveau d'expression est approximativement 2 fois supérieur chez les larves $ZW^{20}$ quels que soient le stade ou le couple d'amorces utilisés.

**(A) Stade 55**




**(B) Stade 56**

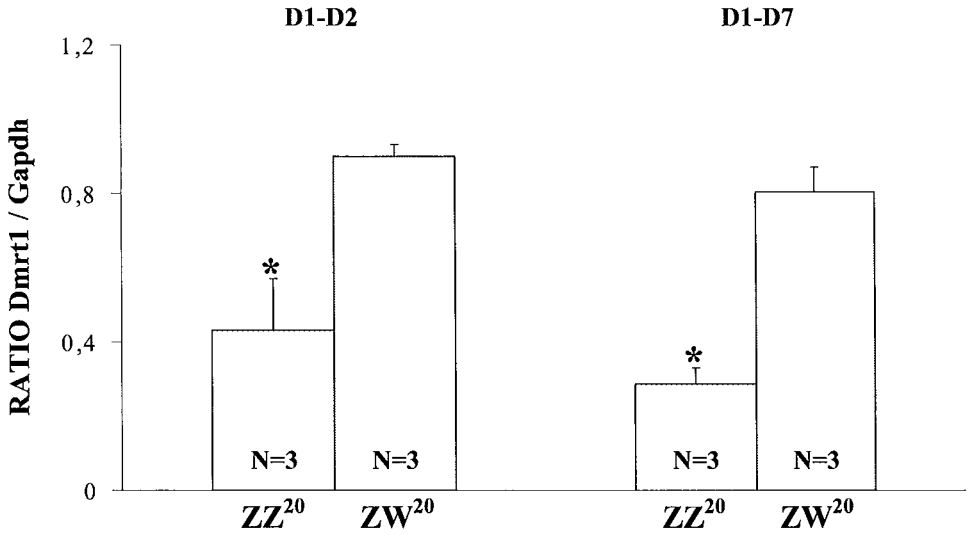



**Figure 42 : Quantification de l'expression de Dmrt1 dans les complexes gonades-mésonéphros chez des larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ au stade 55 et 56.** (A) Les complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ ont été prélevés au stade 55. Chaque échantillon est constitué d'un "pool" de 5 complexes gonades-mésonéphros dont les ARNs totaux ont été amplifiés par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles) à l'aide du couple D1-D7. (B) Un complexe gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ a été prélevé au stade 56. Chaque échantillon d'un seul complexe gonades-mésonéphros a été amplifié par RT-PCR semi-quantitative (28 cycles) à l'aide des couples d'amorces D1-D2 et D1-D7. Dans les deux cas, après hybridation, l'intensité du signal Dmrt1 a été normalisée par rapport à celle de la Gapdh. Le nombre de répétitions pour chaque échantillon est indiqué par le nombre N. Sur chaque histogramme, la barre représente l'écart-type moyen. *, $P<0,05$ *vs.* $ZW^{20}$.

*g) L'expression de Dmrt1 disparaît des gonades femelles au stade juvénile*

Comme aucune expression n'est détectée dans les ovaires adultes, nous avons analysé des stades plus tardifs afin de déterminer le moment de l'arrêt d'expression de ce gène chez les individus femelles. Ainsi, nous avons analysé l'expression de Dmrt1 par RT-PCR qualitative sur des ovaires et testicules d'individus juste métamorphosés et d'individus juvéniles (4 à 6 mois après la métamorphose). Le résultat entre les couples D1-D2 (Fig.43) et D1-D7 (résultat non présenté) est similaire : les transcrits Dmrt1 sont toujours présents dans les gonades de larves $ZW^{20}$ au stade 56 mais ils disparaissent dans les ovaires juvéniles alors que le testicule juvénile présente toujours une expression forte.

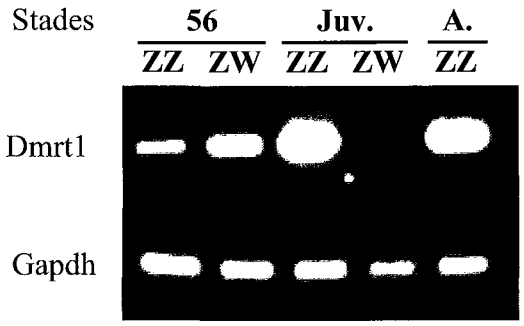



**Figure 43 : Analyse de l'expression de Dmrt1 à des stades tardifs du développement.** Des complexes gonades-mésonéphros de larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ au stade 56 ainsi que des ovaires et testicules de pleurodèles juvéniles (Juv.) et un testicule de mâle adulte (A.) ont fait l'objet d'une analyse par RT-PCR qualitative (35 cycles) avec les couple D1-D2 et D1-D7. La figure représente l'amplification observée avec le couple D1-D2. Les produits de PCR ont été observés sur un gel d'agarose à 1%. La Gapdh sert de témoin.

D) Discussion

Nous avons isolé l'ADNc Dmrt1 chez *Pleurodeles waltl* à partir d'un testicule adulte. L'ADNc contient une région codante de 1131 pb avec des régions 5' et 3' UTR de 45 pb et 605 pb respectivement. L'ADNc Dmrt1 du pleurodèle comporte une ORF potentielle codant une protéine de 377 acides aminés. Les deux régions conservées, le domaine DM de liaison à l'ADN et le domaine riche en résidus proline et sérine, présentent un haut degré d'identité avec ceux des autres espèces. Effectivement, les homologies du domaine DM et du domaine P/S du pleurodèle avec celles de l'homme, la souris, le poulet et la tortue *Trachemys scripta*, varient de 97% à 98% et de 76% à 82% respectivement.

Chez l'homme, le gène DMRT1 a été localisé sur le bras court du chromosome 9 grâce à l'analyse de patients présentant une inversion sexuelle de mâle en femelle (Veitia R. *et al.*, 1997; Flejter W.L. *et al.*, 1998). Il est également autosomal chez le fugu et le

medaka (Brunner B. *et al.*, 2001) alors que chez le poulet, Dmrt1 a été localisé sur le chromosome Z suggérant que ce gène pourrait constituer un déterminant mâle chez les oiseaux et réguler la détermination du sexe de manière dose-dépendante (Nanda I. *et al.*, 1999; Smith C.A. *et al.*, 1999b). Chez le medaka, un homologue de Dmrt1 : DMY localisé sur le chromosome Y est impliqué dans la détermination mâle (Matsuda M. *et al.*, 2002). Chez le pleurodèle, l'amplification de l'ADN génomique d'animaux adultes ZZ, ZW et WW à l'aide d'un couple d'amorces situées sur le même exon a démontré la présence d'un signal quel que soit le sexe génétique de l'individu. Par conséquent, Dmrt1 ne semble pas être lié aux chromosomes sexuels chez notre modèle. Il en est de même chez le seul autre amphibien étudié, la grenouille *Rana rugosa* (Aoyama S. *et al.*, 2003).

L'expression spécifique du testicule détectée chez les pleurodèles adultes est cohérente avec ce qui a été décrit chez de nombreuses espèces comme l'homme (Raymond C.S. *et al.*, 1998; Raymond C.S. *et al.*, 1999b), le wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2003), le poulet (Shan Z. *et al.*, 2000), le lézard *Calotes versicolor* (Sreenivasulu K. *et al.*, 2002), la tortue *Trachemys scripta* (Kettlewell J.R. *et al.*, 2000) la grenouille *Rana rugosa* (Shibata K. *et al.*, 2002) et certains poissons (Marchand O. *et al.*, 2000; Guan G. *et al.*, 2000). Néanmoins, des transcrits Dmrt1 ont été observés dans l'ovaire adulte chez la souris, le wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2003) et la truite (Marchand O. *et al.*, 2000) suggérant une implication de ce gène dans la fonction ovarienne chez les animaux adultes. Chez le tilapia, une protéine DMO codée par un gène différent de Dmrt1 est spécifiquement exprimée dans l'ovaire adulte (Guan G. *et al.*, 2000). Chez le pleurodèle, aucun transcrit n'a été détecté dans l'ovaire adulte par RT-PCR.

Au cours du développement, Dmrt1 est détecté très tôt dans les gonades indifférenciées de larves de pleurodèles. Nous avons amplifié des transcrits Dmrt1 dès le stade 42 chez les larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$. Cette expression précoce a aussi été observée chez l'homme où les transcrits Dmrt1 sont présents en même temps que ceux de Sry (Moniot B. *et al.*, 2000). Il en va de même chez le poulet (Raymond C.S. *et al.*, 1999b; Smith C.A. *et al.*, 1999b), la souris (De Grandi A. *et al.*, 2000; Raymond C.S. *et al.*, 1999b) et le lézard *Calotes versicolor* (Sreenivasulu K. *et al.*, 2002). Par la suite, les transcrits Dmrt1 chez les larves de pleurodèle $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ sont présents pendant toute la période thermosensible (stade 42 à 54) ainsi qu'au stade 55, période du développement où la différenciation gonadique est bien engagée. La détection précoce de Dmrt1 au cours du développement dans les gonades suggère qu'il puisse aussi être impliqué dans le processus de la détermination sexuelle chez le pleurodèle.

Chez toutes les espèces de vertébrés étudiées, Dmrt1 a été décrit comme un facteur de transcription impliqué dans la différenciation testiculaire. L'expression spécifique de Dmrt1 dans les gonades mâles a été conservée des poissons à l'homme (Brunner B. *et al.*, 2001). Par RT-PCR semi-quantitative, nous avons montré que la première différence significative entre les individus $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ apparaît au stade 55. Cependant, le niveau de transcrits Dmrt1 est 1,9 fois supérieur chez les larves femelles par rapport aux larves mâles. La présence de transcrits Dmrt1 a déjà été observée dans les cellules germinales des ovaires en développement chez le lézard *Calotes versicolor* (Sreenivasulu K. *et al.*, 2002), le poulet (Smith C.A. *et al.*, 2003) et le wallaby (Pask A.J. *et al.*, 2003) suggérant également un rôle pour Dmrt1 au cours du développement ovarien, voire dans la gamétogenèse femelle. Chez la truite, les transcrits Dmrt1 sont aussi présents dans l'ovaire mais le niveau de transcrits est 80 plus faible par rapport au testicule avant le début de la différenciation gonadique. Cette différence n'est plus que d'un facteur 40 au cours de la différenciation puis d'un facteur 10 après la différenciation sexuelle (Marchand O. *et al.*, 2000). Chez notre modèle, nous n'avons aucune information sur la localisation cellulaire des transcrits Dmrt1. De plus, il est possible que les transcrits Dmrt1 présents chez les larves femelles ne soient pas traduits, comme c'est le cas dans les cellules germinales du testicule fœtal de la souris (Raymond C.S. *et al.*, 2000). Il en est de même pour le facteur de transcription Foxl2, un gène intervenant dans la différenciation ovarienne qui est transcrit à la fois dans les cellules germinales et les cellules de la granulosa de l'ovaire mature mais n'est traduit que dans les cellules de la granulosa (Cocquet J. *et al.*, 2002).

Comme l'expression de Dmrt1 est testicule-spécifique chez le pleurodèle adulte, nous avons supposé qu'il pourrait jouer un rôle tardif dans la différenciation testiculaire comme chez la grenouille *Rana rugosa* (Shibata K. *et al.*, 2002). Effectivement, chez cette espèce, Dmrt1 n'est exprimé qu'au moment où la métamorphose est complète chez les mâles et le niveau de transcrits Dmrt1 devient plus important deux mois après (Shibata K. *et al.*, 2002). Chez la truite adulte, Dmrt1 est exprimé pendant la spermatogenèse (Marchand O. *et al.*, 2000). Chez le pleurodèle, les transcrits Dmrt1 sont toujours présents chez les individus $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ au stade 56, après la métamorphose. A ce stade, le niveau de transcrits Dmrt1 est toujours plus important chez les individus femelles par rapport aux individus mâles. Cependant, au stade juvénile, environ 4 à 5 mois après la métamorphose, les transcrits sont toujours présents dans le testicule mais disparaissent des ovaires. Des études plus approfondies, de localisation de la protéine ou des techniques d'interférence ARN permettront d'expliquer le rôle précis de Dmrt1 chez les individus femelles et mâles.

Les trois transcrits de tailles différentes résultant de la RT-PCR au cours du développement ont montré après séquençage être issus de plusieurs évènements d'épissage alternatif. En effet, le premier transcrit de 786 nt, le plus abondant, correspond à l'ARNm complet. Le deuxième de 600 nt a perdu l'exon 2 et le dernier de 504 nt a perdu l'exon 3. Ces deux derniers transcrits codent pour des protéines tronquées qui possèdent quand même tout (504 nt) ou une partie (600 nt) du domaine DM. De plus, l'amplification par RT-PCR de ces deux transcrits ne montre aucune variation caractéristique d'un sexe ou d'un stade. Un phénomène d'épissage alternatif a déjà été décrit chez *Calotes versicolor* où trois transcrits ont également été observés mais l'épissage touche uniquement l'exon 3 (Sreenivasulu K. *et al.*, 2002). Chez un invertébré, le corail *Acropora millepora*, un gène codant une protéine avec un domaine DM a été identifié et quatre transcrits différents sont générés par l'utilisation alternative de deux sites de polyadénylation et par un mécanisme d'épissage alternatif affectant l'exon codant le domaine DM (Miller S.W. *et al.*, 2003). Chez les poissons, la souris et l'homme, de nombreux gènes Dmrt ont été isolés. L'arrangement des trois gènes Dmrt1, Dmrt2 et Dmrt3 à la fin télomérique du chromosome 9 est conservé chez l'homme, le medaka et le fugu (Brunner B. *et al.*, 2001). Chez la souris, 6 gènes Dmrt en plus de Dmrt1 ont été isolés dont trois sont exprimés pendant la différenciation gonadique (Kim S. *et al.*, 2003). Notamment, le niveau de transcrits Dmrt7 est plus important chez les embryons femelles suggérant que ce gène ou d'autres gènes DM peuvent se substituer au rôle de Dmrt1 pendant la différenciation ovarienne. Effectivement, les souris knock-out Dmrt1$^{-/-}$ femelles sont fertiles et montrent que Dmrt1 n'est pas essentiel pour la différenciation ovarienne (Raymond C.S. *et al.*, 2000).

Pour le moment nous n'avons isolé que le gène Dmrt1 chez notre modèle, mais nous ne pouvons pas exclure la présence d'autres gènes DM. Le rôle de Dmrt1 au cours de la différenciation gonadique et notamment dans la différenciation testiculaire est contesté. Il est clair que Dmrt1 présente une expression spécifique du testicule à partir du stade juvénile. Il est aussi présent dans les gonades mâles au cours du développement. Cependant, le niveau de transcrits est plus important dans les gonades femelles aux stades 55 et 56. Ce dernier résultat a été confirmé à la fois par séquençage et par utilisation d'un autre couple d'amorces. Il reste à vérifier si les transcrits détectés dans les gonades femelles sont effectivement traduits, mais aussi à tester si cette protéine DMRT1 est active avant d'envisager l'implication de Dmrt1 dans la différenciation ovarienne.

## 4) Recherche de gènes différentiellement exprimés pendant l'inversion sexuelle chez *Pleurodeles waltl*

(non soumis)

### A) Introduction

La technique d'hybridation soustractive peut permettre de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés au cours de la détermination et différenciation sexuelle. Chez la souris, cette technique a permis d'isoler de nombreux gènes impliqués dans la différenciation testiculaire comme les gènes de la testatine, de la nexine-1 et de la vanine-1 (Kanno Y. *et al.*, 1999; Bowles J. *et al.*, 2000; Grimmond S. *et al.*, 2000). Récemment, l'hybridation soustractive réalisée au stade 12-12,5 jpc a conduit à l'isolement de 272 clones différentiellement exprimés (McClive P.J. *et al.*, 2003). Sur ces clones, seulement 3% sont surexprimés dans l'ovaire alors que 26% sont surexprimés pendant la différenciation testiculaire. Parmi eux, de nombreux gènes de fonction inconnue ont été identifiés mais aussi certains gènes déjà décrits comme la vanine 1 ou Dhh (McClive P.J. *et al.*, 2003).

Dans le but de rechercher des gènes impliqués spécifiquement dans le processus de l'inversion de la différenciation gonadique des individus ZW sous l'effet de la température chez le pleurodèle, nous avons utilisé, comme dans l'étude précédente, une méthode de clonage par soustraction (PCR-Select$^{TM}$ cDNA substraction kit, Clontech). Deux soustractions réciproques ont été réalisées afin de mettre en évidence des messagers exprimés ou réprimés spécifiquement sous l'effet de la température. Pour ce faire, des complexes gonades-mésonéphros de larves ZW élevées à 20°C ($ZW^{20}$) ou à 32°C ($ZW^{32}$) pendant toute la période thermosensible ont été prélevés au stade 52, avant le début de la différenciation gonadique. La première soustraction des messagers de larves $ZW^{20}$ avec ceux des larves $ZW^{32}$ permet de révéler les transcrits présents pendant la différenciation femelle et réprimés par la température, alors que la soustraction réciproque met en évidence des transcrits spécifiquement induits par la température chez les larves $ZW^{32}$. Lors de cette dernière hybridation, des messagers de larves $ZW^{32}$ prélevés après la période thermosensible ont également été soustraits afin d'éliminer toutes les expressions induites par la température et n'intervenant pas spécifiquement dans l'inversion sexuelle au cours de la TSP. En effet, l'inhibition de l'aromatase se produit pendant cette période et non pas après. Il existe donc un élément TSP-spécifique impliqué dans l'inhibition de l'aromatase

par la température.

B) Matériel et méthodes

*a) Extraction des ARNs totaux*

Le protocole détaillé a déjà été décrit précédemment (voir partie résultats I.1). Lors de cette étude, des «pools» de 25 complexes gonades-mésonéphros aux stades 52 et 54 ont été constitués à partir de larves $ZW^{20}$ et de larves $ZW^{32}$ et les ARNs totaux ont ensuite été extraits en utilisant la technique au TRIzol (Invitrogen).

*b) Synthèse et amplification des ADNc*

Du fait des quantités très limitantes de matériel biologique, les ADNc ont d'abord été amplifiés par PCR (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech). Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1µg d'ARNs totaux selon les instructions fournies. Au cours de cette synthèse, une séquence connue est rajoutée aux extrémités des ADNc, ce qui permet ensuite une amplification par PCR (Advantage 2 Polymerase Mix, Clontech). Le protocole PCR est le suivant :

| | | |
|---|---|---|
| 95°C | 1 minute | |
| 95°C | 15 secondes | 18 cycles |
| 65°C | 30 secondes | |
| 68°C | 6 minutes | |

Préalablement, nous avons testé différentes amplifications de 15, 18, 21 et 24 cycles et après migration des produits de PCR sur gel d'agarose, nous avons choisi 18 cycles pour nous situer dans la phase exponentielle d'amplification (Fig.44).

*c) Hybridation soustractive*

Deux soustractions différentes ont été réalisées à l'aide du kit (PCR-Select™ cDNA Substraction Kit, Clontech). Pour la première, des ADNc de larves $ZW^{20}$ prélevés au stade 52 ont été utilisés comme «tester» et des ADNc de larves $ZW^{32}$ également prélevés au stade 52 comme «driver». La deuxième soustraction est l'inverse de la

précédente, les larves $ZW^{32}$, précédemment utilisées comme «driver» ont été utilisées comme «tester» et les larves $ZW^{20}$ comme «driver» (Fig.44). En plus, des ADNc de larves $ZW^{32}$ ont été prélevés après la période thermosensible (stade 54 tardif) et ajoutés comme «driver» avec les ADNc des larves $ZW^{20}$ afin d'éliminer toutes les expressions dépendantes uniquement de la température.

Les ADNc précédemment amplifiés ont été digérés avec l'enzyme *Rsa*I afin de générer des bouts francs pour permettre l'étape de ligation suivante (Fig.44). Deux adaptateurs différents (1 et 2R) ont été ligués sur les ADNc «testeur». Après deux hybridations successives, les ADNc avec des séquences adaptatrices différentes à leurs extrémités ont été amplifiés différentiellement par PCR. Une PCR nichée a permis d'enrichir ces séquences et de réduire le bruit de fond (Fig.44). Les produits de PCR résultants ont été purifiés puis clonés dans un plasmide pGEMT-easy. Après la transformation dans les bactéries *E.Coli* TG1, les clones obtenus ont été repiqués et stockés à -80°C.

*d) Criblage par PCR des clones transformants*

La recherche de la présence d'inserts dans les plasmides a été réalisée par une technique de PCR sur colonies bactériennes. Les bactéries ont été déposées dans un tampon contenant 25 mM de chaque dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 0,1 unité de Taq Polymérase (Invitrogen) et 0,4 pM de chaque amorce dans un volume total de 25 µl. Les amorces T7 5'-AATACGACTCACTATAGGG-3' et SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3' se fixant sur le plasmide pGEMT-easy sont utilisées. Le programme PCR suivant est répété 35 fois : dénaturation à 95°C pendant 1 minute, hybridation à 55°C pendant 30 secondes et élongation à 75°C pendant 1 minute.

*e) Criblage par hybridation des clones d'intérêt*

Les clones ont été analysés par hybridation sur colonies. Pour ce faire, ils ont été repiqués et transférés sur une membrane de nylon Hybond N (Amersham). Après quatre traitements successifs au SDS 10% pendant 3 minutes, dénaturation (NaOH 0,25 M, NaCl 1,5 M) pendant 5 minutes, neutralisation (Tris-HCl pH 8,0 1 M, NaCl 1,5 M) pendant 5 minutes et enfin un traitement au SSC 2x pendant 5 minutes, l'ADN a été fixé sur la membrane par un chauffage à 80°C pendant deux heures. La membrane a alors été préhybridée à 65°C dans le tampon suivant : SSC 6x, SDS 0,5%, Denhardt's 5x, ADN de

sperme de saumon 100 µg/ml puis hybridée pendant 16 heures à 65°C avec une sonde marquée au $\alpha^{32}$P-dCTP (Random Primed DNA Labelling Kit, Roche) dans le tampon : SSC 6x, EDTA 10 mM, Denhardt's 1x, ADN de sperme de saumon 50 µg/ml. La sonde correspond aux ADNc issus de la première amplification des ADNc, soit de larves $ZW^{20}$, soit de larves $ZW^{32}$, prélevés au stade 52. Après deux lavages de 10 minutes à température ambiante dans une solution de SSC 2x, SDS 0,5%; puis 2 lavages de 30 minutes à 50°C puis 55°C dans une solution de SSC 0,1x, SDS 0,2%; la membrane a été mise au contact d'un film autoradiographique (Hyperfilm MP, Amersham) pendant plusieurs jours à -80°C. Chaque membrane a été hybridée deux fois, avec la sonde $ZW^{20}$ puis $ZW^{32}$ respectivement. Entre chaque hybridation, la membrane a été déshybridée par deux lavages de 30 minutes dans un tampon SDS 0,5% à 100°C.

Après comparaison des hybridations avec la sonde $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$, les clones différentiellement exprimés ont été séquencés (Genome Express).

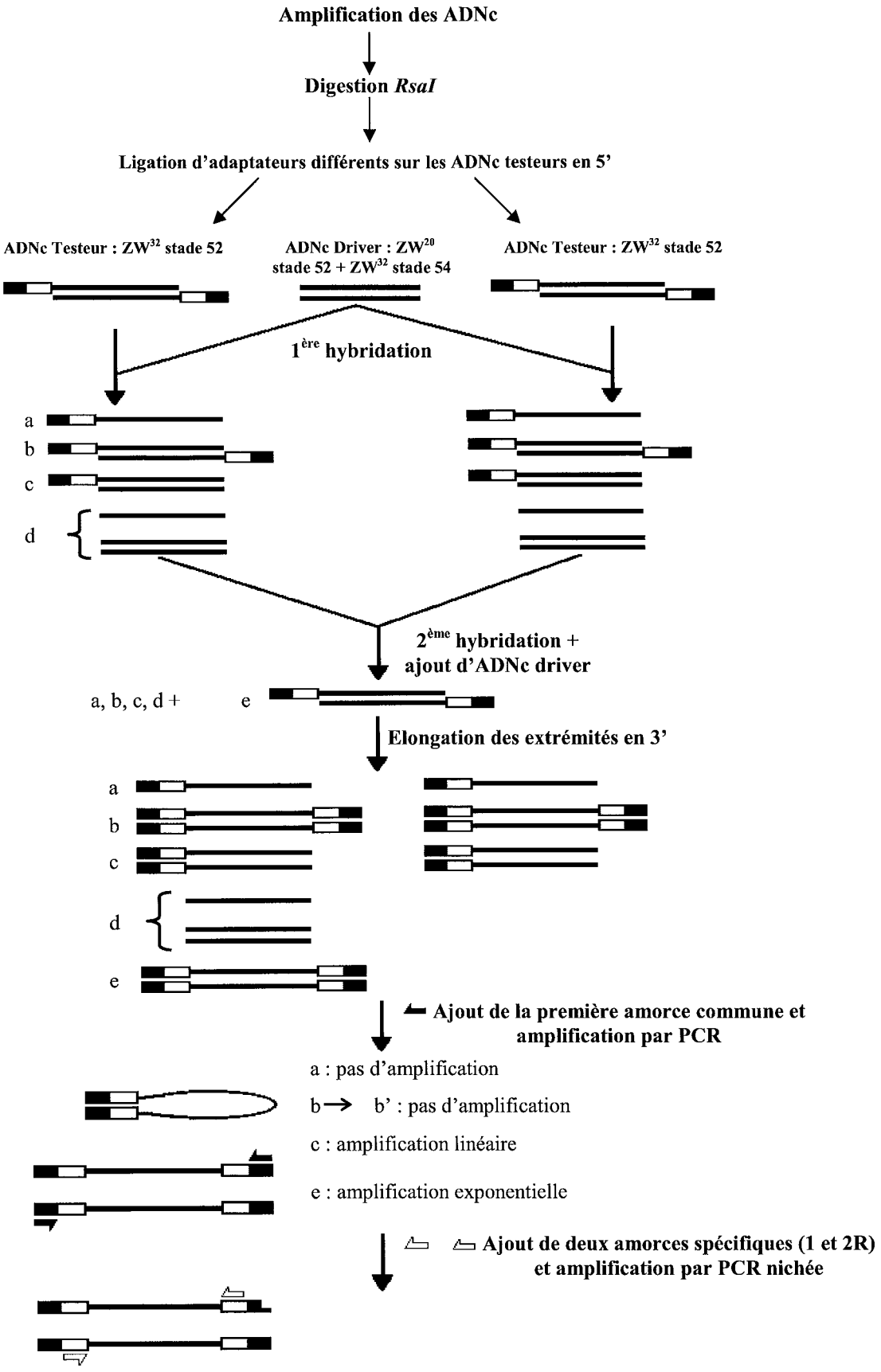



**Figure 44 : Schéma de synthèse du protocole du clonage différentiel.** Seule l'hybridation de type

e, avec des ADNc comportant des adaptateurs différents, peut conduire à une amplification exponentielle (d'après Clontech).

C) Résultats

Pour chacune des deux soustractions : $ZW^{20}$ - $ZW^{32}$ (permettant d'obtenir des ADNc femelles réprimés par la température) et $ZW^{32}$ - ($ZW^{20}$+$ZW^{32}$ du stade 54) (permettant d'obtenir des ADNc induits par la température et spécifiques de la TSP), 2000 clones ont été repiqués et stockés dans des plaques 96 puits.

Les résultats présentés concernent la soustraction réciproque des ADNc issus de larves $ZW^{32}$.

Nous avons commencé par vérifier la présence d'inserts dans les plasmides par PCR. Après migration sur gel d'agarose à 1%, nous avons observé que pratiquement tous les clones contenaient un insert (Fig.45). Leur taille varie de 400 pb à environ 1 kb sur le gel présenté. Néanmoins, d'autres clones possédant des inserts de tailles plus petites ont été détectés.

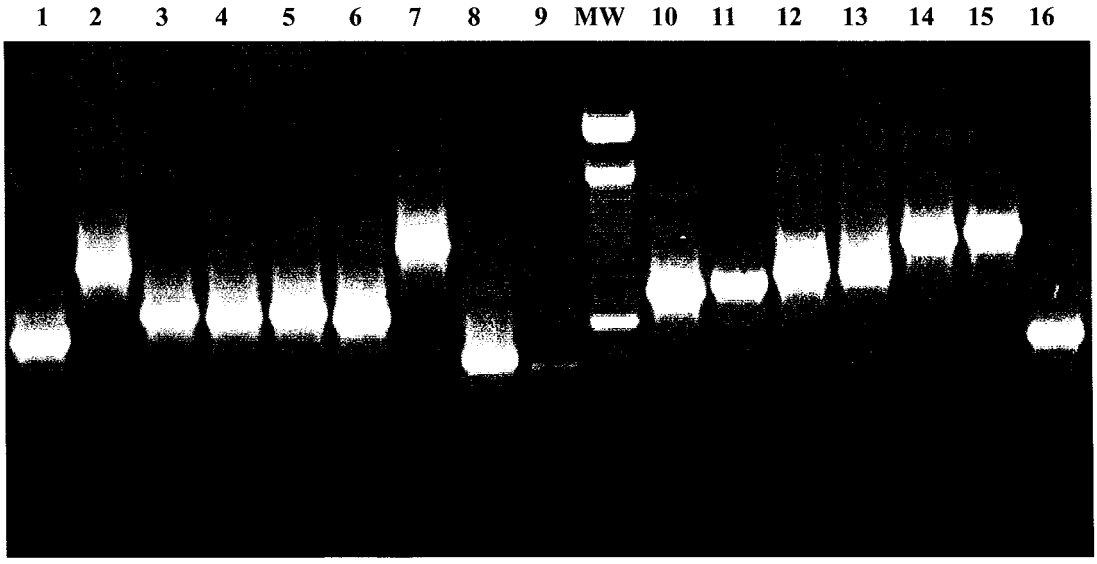



**Figure 45 : Analyse des différents clones par PCR.** La PCR a été réalisée sur une partie de la colonie bactérienne. Les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 1%. Les différents inserts ont été directement analysés sur le gel. Sur cette photo, 16 clones sont présentés. MW correspond au marqueur de taille dont les bandes les plus intenses sont du haut vers le bas : 1,5 kb; 1 kb et 600 pb.

Nous avons commencé le criblage par hybridation sur colonies sur deux plaques de 96 puits. Chaque membrane a été hybridée deux fois avec les ADNc amplifiés par PCR de larves $ZW^{20}$ puis ceux de larves $ZW^{32}$, prélevées au stade 52, puis marqués au $\alpha^{32}$P-dCTP. Nous avons comparé les deux hybridations avec les deux sondes différentes et avons recherché des clones présentant une intensité de marquage plus forte avec la sonde $ZW^{32}$ qu'avec la sonde $ZW^{20}$ en tenant compte de la variation de marquage des deux membranes (Fig.46). Trois clones ont ainsi été sélectionnés et sont susceptibles de correspondre à des messagers spécifiquement surexprimés sous l'effet d'un traitement thermique des larves pendant la période thermosensible (Fig.46). Les deux premiers clones : 1-30 et 1-40 proviennent de l'analyse de la première plaques 96 puits (Fig.46), le troisième : 2-42 a été sélectionné à partir de la deuxième plaque 96 puits (résultat non présenté).

Sonde $ZW^{20}$ stade 52

Sonde $ZW^{32}$ stade 52

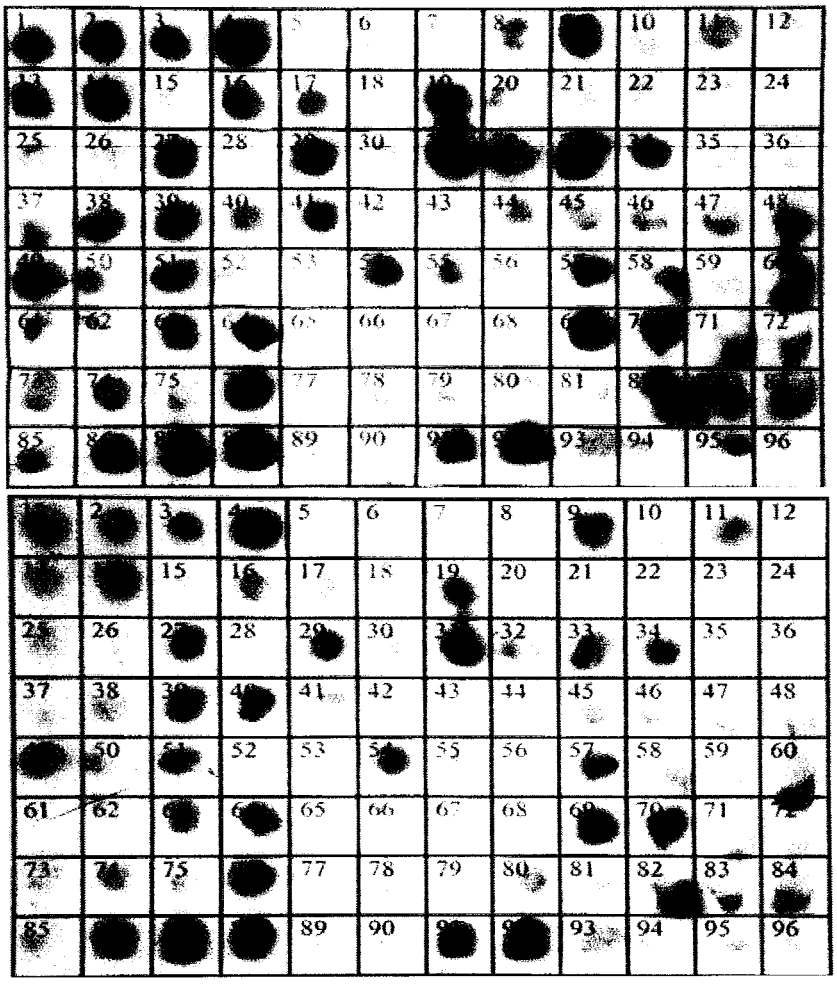


**Figure 46 : Hybridation sur colonies des clones 101 à 196 issus de la soustraction réalisée à partir des ADNc de larves $ZW^{32}$.** (A) Membrane hybridée avec les ADNc issus des larves $ZW^{20}$ marqués au $\alpha^{32}$P-dCTP (exposition 1 semaine). (B) Membrane précédente déshybridée puis réhybridée avec les ADNc issus des larves $ZW^{32}$ marqués au $\alpha^{32}$P-dCTP (exposition 1 semaine). Sur cette première plaque 96 puits,

deux clones 1-30 (n°30) et 1-40 (n°40) présentent une réponse plus intense sur l'hybridation en B que sur l'hybridation en A.

Ces différents clones sélectionnés ont été purifiés et analysés sur gel d'agarose à 1% après une digestion enzymatique par *EcoR*I. Les inserts sont de 147 pb, 319 pb et 298 pb pour les clones 1-30, 1-40 et 2-42 respectivement (Fig.47).

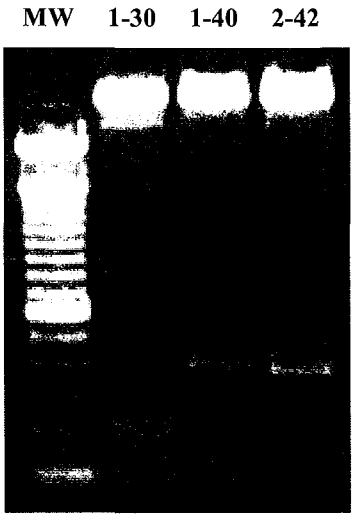



**Figure 47 : Profil des trois clones 1-30, 1-40 et 2-42 sur gel d'agarose après digestion par *EcoR*I.** MW correspond au marqueur de taille dont les bandes les plus intenses sont du haut vers le bas: 1,5 kb; 1 kb et 600 pb.

Ces trois clones ont ensuite été séquencés (Genome Express) (Fig.48A). Les amorces liguées 1 et 2R qui ont ensuite été utilisées en PCR (Fig.44) ont été retrouvées à chaque extrémité de la séquence des trois clones démontrant que l'on a bien amplifié différentiellement des ADNc avec des séquences adaptatrices 1 et 2R différentes à leur extrémité (Fig.48A). De plus, la moitié du site *Rsa*I (GTAC), qui nous avait permis de générer des bouts francs pour permettre la ligation des différents adaptateurs, est également détectée à chaque extrémité.

L'analyse de ces trois clones par comparaison de séquences avec une banque de données Blast (Altschul *et al.*, 1997) n'a abouti à aucun résultat. Effectivement, ces clones sont courts et tous situés dans la région 3' non codante de l'ADNc puisque l'extrémité poly(A) est présente. La caractérisation complète de ces clones nécessite d'entreprendre une RACE 5'. Néanmoins, nous avons observé que les clones 1-40 et 2-42 étaient identiques : ils varient seulement par l'utilisation de deux sites de polyadénylation différents (Fig.48B). A cause de la taille des inserts et du contenu abondant en adénine dans la séquence, il était difficile de choisir des oligonucléotides spécifiques afin de

confirmer l'expression différentielle de ces clones au stade 52.

**(A)**

>CLONE : 1-30

TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT
ACAAGCACGAACTAACTAACAAGAAAGGAAGGAGTCGAACCCCCCTGAGCCGATTTCAAGTCG
ACCATATAACCAATCTACCACTTTCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAA
GTACCTCGGCCGCGACCACGCT

>CLONE : 1-40

TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT
ACAGCTTTATTAATAAAGGACACAACCTAAAACATGAATAAGGATTATATTAATTTAAGTATTT
AACCATGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCATAGGAAAGCGTCAAAGCCCAGTTTACACAACACTT
GTTATCCCAATAAATAATCTAAATTCACACAACATATTAAGCCTATCTATTAAATAGATGAGTTT
ATACTAGAATAAGTAATAAGAACATATTCTCTACATGCATGTGTAAATCAGAACGAACAAATCA
CTGATAATTAACGACCAAATATATTAAAAATCAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
GTACCTCGGCCGCGACCACGCTA

>CLONE : 2-42

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
ACAGCTTTATTAATAAAGGACACAACCTAAAACATGAATAAGGATTATATTAATTTAAGTATTT
AACCATGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCATAAGAAAGCGTCAAAGCCCAGTTTACACAACACTT
GTTATCCCAATAAATAATCTAAATTCACACAACATATTAAGCCTATCTATTAAATAGATGAGTTT
ATACTAGAATAAGTAATAAGAACATATTCTCTACATGCATGTGTAAATCAGAACGAACAAATCA
CTGATAATTAACGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
GTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGA

**(B)**

```
140 AGCTTTATTAATAAAGGACACAACCTAAAACATGAATAAGGATTATATTAATTTAAGT
242 AGCTTTATTAATAAAGGACACAACCTAAAACATGAATAAGGATTATATTAATTTAAGT

140 ATTTAACCATGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCATAGGAAAGCGTCAAAGCCCAGTTTAC
242 ATTTAACCATGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCATAAGAAAGCGTCAAAGCCCAGTTTAC

140 ACAACACTTGTTATCCCAATAAATAATCTAAATTCACACAACATATTAAGCCTATCTA
242 ACAACACTTGTTATCCCAATAAATAATCTAAATTCACACAACATATTAAGCCTATCTA

140 TTAAATAGATGAGTTTATACTAGAATAAGTAATAAGAACATATTCTCTACATGCATGT
242 TTAAATAGATGAGTTTATACTAGAATAAGTAATAAGAACATATTCTCTACATGCATGT

140 GTAAATCAGAACGAACAAATCACTGATAATTAACGACCAAATATATTAAAAATCAAGA
242 GTAAATCAGAACGAACAAATCACTGATAATTAACGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

140 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
242 AAAA
```

**Figure 48 : Séquençage des trois clones retenus : 1-30, 1-40, 2-42.** (A) Les amorces 1 et 2R utilisées pour la PCR nichée sont en bleu et en rouge respectivement. La séquence nucléotidique des différents clones est en noir. La moitié du site *Rsa*I (GTAC) est représentée en vert. Le site *Rsa*I au niveau

des extrémités 3' résulte des amorces utilisées lors de l'amplification des ADNc. (B) Alignement des séquences nucléotidiques des clones 1-40 et 2-42. Les acides aminés conservés sont grisés.

## D) Discussion

A l'issue des deux hybridations soustractives, nous avons obtenu de nombreux clones (4000-6000 clones). L'analyse des premiers clones par hybridation sur colonie semble encourageante. Elle a conduit à l'isolement de trois clones qui ont ensuite été séquencés. L'étude de la séquence de ces différents clones nous a permis de vérifier que les soustractions réalisées étaient conformes à ce qui était décrit dans le protocole. La présence de la moitié du site *Rsa*I avec des adaptateurs 1 et 2R à chaque extrémité de la séquence des différents clones confirme que les différentes étapes du protocole se sont déroulées correctement. Néanmoins, il est dommage que ces différents clones soient situés dans la région 3' non codante puisque nous n'avons pu obtenir aucune information par Blast, ni confirmer une expression différentielle de ces clones par RT-PCR. Comme chez le tilapia, où un clone isolé par la technique de Differential display qui ne comptait que 300 pb dans la région 3' non codante de l'ADNc, n'a pu être déterminé (D'Cotta H. *et al.*, 2001a). Cependant, parmi les trois clones retenus, deux sont identiques et présentent deux signaux de polyadénylation différents. Sur ces derniers, une stratégie de RACE-PCR en 5' pourrait être engagée. Pour le moment, nous avons décidé de continuer l'analyse des autres clones par la technique d'hybridation sur colonies. Ainsi, nous espérons isoler des clones de plus grandes tailles afin de pouvoir choisir des amorces spécifiques et ainsi confirmer qu'ils font effectivement l'objet d'une expression différentielle entre des complexes gonades-mésonéphros de larves $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$ prélevés au stade 52.

# CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Chez *Pleurodeles waltl*, l'activité aromatase augmente exponentiellement dans les gonades femelles alors qu'elle reste faible dans les gonades mâles à partir du stade 52, avant le début de la différenciation histologique des gonades. Cette augmentation est bloquée par une température élevée lorsqu'elle est appliquée au cours de la période thermosensible. Notre étude visait à rechercher les facteurs responsables de l'augmentation d'activité aromatase dans les gonades femelles, et à mieux cerner la cible de la température au cours du processus d'inversion sexuelle.

## I) Régulation de l'aromatase et différenciation gonadique

### 1) Expression de l'aromatase

L'augmentation de l'activité aromatase est-elle liée à un accroissement du niveau de transcrits? Les études d'expression de l'aromatase ont confirmé l'implication de cette enzyme dans la différenciation ovarienne chez *Pleurodeles waltl* : les transcrits aromatase sont détectés dès le stade 44 chez les larves ZZ et ZW puis augmentent significativement chez les larves femelles à partir du stade 54 (Fig.49). Ces résultats observés au niveau transcriptionnel sont en accord avec les mesures d'activité aromatase faites précédemment (Chardard D. *et al.*, 1995). Néanmoins, le niveau de messagers aromatase devient plus important dans les gonades femelles seulement à partir du stade 54, soit deux stades après l'augmentation d'activité aromatase, qui a lieu au stade 52 (Chardard D. *et al.*, 1995). Par ailleurs, la différence observée entre l'activité enzymatique et l'expression du gène aromatase est considérable au stade 54 : le ratio des messagers aromatase / Gapdh n'est que 2 fois plus élevé chez les larves femelles par rapport à celui des larves mâles alors que l'activité aromatase est 40 fois supérieure (Chardard D. *et al.*, 1995). Ces différences pourraient être attribuées à un problème de sensibilité de la technique de RT-PCR semi-quantitative. A l'inverse, elles pourraient suggérer l'implication de mécanismes post-transcriptionnels pouvant affecter la production ou l'activité de l'enzyme. Ainsi, l'activité aromatase pourrait être contrôlée par un processus rapide de phosphorylations comme chez la caille. Chez cette dernière, les activateurs et inhibiteurs de kinases sont capables de modifier rapidement l'activité aromatase dans des homogénats hypothalamiques

(Balthazart J. *et al.*, 2001). Des sites de phosphorylation ont été identifiés sur la protéine aromatase de cet oiseau (Balthazart J. *et al.*, 2003). Les sites consensus de phosphorylation ont aussi été recherchés chez le pleurodèle à l'aide du programme NETPHOS 2.0 (Blom N. *et al.*, 1999). Ainsi, 19 sites de phosphorylation, avec un score supérieur à la valeur critique 0,5, ont été prédits dont 11 résidus sérines, 3 résidus thréonines et 5 résidus tyrosines. Cependant, la recherche des séquences consensus reconnues par les protéines kinases pouvant affecter l'activité aromatase a révélé seulement 7 résidus différents dont 5 sérines sur 11, 1 thréonine sur 3 et 1 tyrosine sur 5 (Gattiker A. *et al.*, 2002). Pour le moment, nous n'avons aucune information sur le mode de régulation post-transcriptionnelle de l'aromatase chez notre modèle. A court terme, l'utilisation d'activateurs ou d'inhibiteurs de kinases permettra de vérifier l'hypothèse précédente chez le pleurodèle.

Chez des larves $ZW^{32}$, la température agit en modulant directement ou indirectement l'activité de l'aromatase puisque cette dernière est identique à celle des mâles $ZZ^{20}$ (Chardard D. *et al.*, 1995). Les études d'expression de l'aromatase réalisées au stade 54 ont abouti à un résultat similaire suggérant que la température module aussi l'aromatase au niveau transcriptionnel. Toutefois, la température n'agit que si le traitement thermique a lieu au cours de la TSP : l'élevage de larves ZW à 32°C pendant 48 heures au stade 53 entraîne une diminution de l'activité aromatase alors qu'aux stades 55 et 56, la température n'a plus d'effet (Chardard D. *et al.*, 1995). Les études au niveau transcriptionnel montrent également que l'expression de l'aromatase n'est pas modifiée lorsque le chauffage de 48 heures est effectué à la fin de la TSP confirmant que la température régule bien l'activité et l'expression de l'aromatase mais uniquement pendant la TSP. D'après le résultat précédent, il semble que la régulation de cette enzyme soit indirecte et qu'un facteur thermosensible présent uniquement au cours de la TSP soit impliqué dans l'inhibition de l'activité et de l'expression de l'aromatase chez les larves $ZW^{32}$.

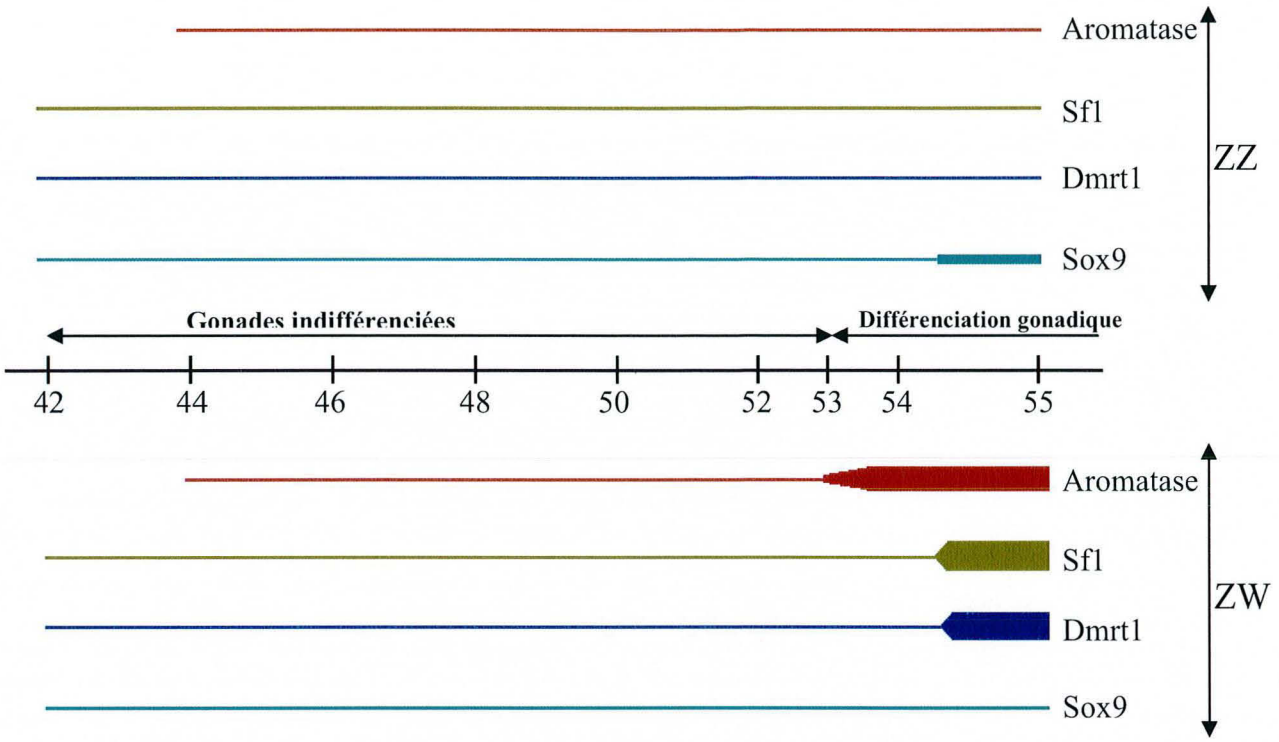



**Figure 49 : Profil d'expression des gènes aromatase, Sf1, Dmrt1 et Sox9 au cours de la différenciation sexuelle chez *Pleurodeles waltl.*** Les différents stades 42 à55 sont représentés sur la ligne au centre. Les profils d'expression des quatre gènes : aromatase en rouge, Sf1 en vert, Dmrt1 en bleu et Sox9 en turquoise sont présentés chez les larves mâles ZZ et les larves femelles ZW.

## 2) Régulation de l'aromatase par la testostérone

D'après les observations précédentes, l'augmentation de l'activité et de l'expression de l'aromatase demeure assez tardive par rapport à la TSP supposant que d'autres gènes, situés plus en amont dans la cascade génique et constituant des cibles potentielles de la température, sont impliqués dans l'initiation de la surexpression de cette enzyme chez les individus femelles.

L'effet paradoxal qui conduit à l'inversion sexuelle de larves ZZ après l'application de testostérone laisse supposer que cette hormone pourrait être impliquée dans l'activation de l'aromatase. Effectivement, il a été proposé que cet effet résulte de la conversion de la testostérone en œstradiol par l'aromatase. Chez le pleurodèle, cette hypothèse a récemment été confortée par l'inversion sexuelle de larves ZW par un androgène non aromatisable, la DHT (Chardard D. *et al.*, 2003). Ce dernier n'induit aucune inversion de la différenciation gonadique des larves ZZ (Chardard D. *et al.*, 2003). Chez les oiseaux, la testostérone a déjà

été décrite comme activateur de l'aromatase cérébrale (Fusani L. *et al.*, 2001). Récemment, chez la grenouille *Rana rugosa*, il a été montré que le taux de messagers AR élevé chez les mâles module l'expression de l'aromatase (Ohtani H. *et al.*, 2003).

Une éventuelle régulation de l'aromatase par la testostérone chez le pleurodèle peut être abordée par une étude de l'inversion sexuelle induite par la température d'élevage. En effet, le chauffage des larves ZW à 32°C pendant toute la TSP conduit au développement de mâles fonctionnels et l'activité ainsi que le niveau d'expression de l'aromatase sont alors identiques à ce qui est observé chez les larves $ZZ^{20}$. Donc, si l'ajout de testostérone au cours d'un chauffage masculinisant de larves ZW permet de recouvrer un développement femelle, il est alors possible d'envisager que le site d'action de la température soit situé en amont de l'aromatase. La température pourrait inhiber la biosynthèse de stéroïdes, et en particulier celle de la testostérone. En effet, dans les cellules de Leydig murines tumorales, un choc thermique a une activité anti-stéroïdogénique liée à l'inhibition de la synthèse de la protéine StAR (Liu Z. et Stocco D.M. 1997). Une variation du métabolisme de la testostérone favorisant la synthèse d'androgènes non aromatisables, plutôt que d'œstradiol *via* l'aromatase, peut aussi être envisagée. Il a été récemment montré qu'à partir de testostérone, l'aromatase gonadique porcine pouvait synthétiser de la 1βOH-testostérone en proportion identique à l'oestradiol (Corbin C.J. *et al.*, 2004). Lors d'un traitement thermique réalisé pendant la TSP, l'activité de l'aromatase pourrait être orientée vers la production de 1βOH-testostérone, composé non aromatisable pouvant influencer la différenciation sexuelle. Enfin, la liaison des stéroïdes sur leur récepteur pourrait entrer en compétition avec un autre ligand produit sous l'effet de la température comme les protéines de chocs thermiques (Pratt W.B. *et al.*, 1996). Pour le moment, l'application de testostérone lors d'un chauffage de larves ZW à 32°C pendant toute la TSP a donné un premier résultat, qui reste à confirmer, et qui semble conduire à une féminisation des larves $ZW^{32}$.

### 3) Autres gènes susceptibles d'être impliqués dans la différenciation gonadique chez le pleurodèle

Puisque nous avons montré une différence d'expression de l'aromatase chez le pleurodèle, nous avons étudié d'autres gènes comme Sf1, Sox9 et Dmrt1. Ces gènes connus pour intervenir dans la différenciation sexuelle chez de nombreuses espèces de vertébrés pourraient agir en amont de l'aromatase et participer à sa régulation au cours du développement femelle, et éventuellement être affectés par le traitement thermique.

A) Expression de Sf1

Comme cela a déjà été décrit chez les mammifères, l'aromatase pourrait aussi être régulée par SF1 chez le pleurodèle (Lynch J.P. *et al.*, 1993; Michael M.D. *et al.*, 1995). Sf1 est le premier gène que nous avons isolé et étudié chez notre modèle. Les transcrits Sf1 sont détectés très tôt au cours du développement urogénital, dès le stade 42 (Fig.49). Ils sont présents avant les messagers aromatase qui ne sont détectés qu'à partir du stade 44. Puis, les messagers Sf1 augmentent significativement au cours de la différenciation ovarienne comme chez le poulet, la grenouille *Rana catesbeiana* et l'alligator (Smith C.A. *et al.*, 1999a; Mayer L.P. *et al.*, 2002; Western P.S. *et al.*, 2000; Mayer L.P. *et al.*, 2002; Western P.S. *et al.*, 2000). Cependant, l'augmentation du niveau des transcrits Sf1 chez les larves ZW est tardive, elle n'est observée qu'au stade 55, après le début de la différenciation histologique des gonades qui débute au stade 53. Le fait que nos analyses n'aient pu être réalisées que sur des complexes gonades-mésonéphros jusqu'au stade 54 pourrait expliquer ce résultat. En effet, des transcrits Sf1 sont présents dans le mésonéphros et pourraient masquer une différence gonadique avant le stade 55. Pourtant, l'étude effectuée sur des gonades isolées prises au stade 55 aboutit à un résultat similaire à celui observé sur des complexes gonades-mésonéphros. Bien que l'on ne puisse pas exclure une différence significative plus précoce entre les larves ZW et ZZ, on peut affirmer que le niveau de transcrits Sf1 est significativement plus important dans les gonades femelles au stade 55. Les profils d'expression de Sf1 et de l'aromatase évoluent de façon identique : le niveau de leurs transcrits augmente pendant la différenciation ovarienne. Cependant, cette expression différentielle entre les larves $ZZ^{20}$ et $ZW^{20}$ est détectée un stade plus tôt pour l'aromatase, rejetant une éventuelle régulation de l'aromatase par SF1. Toutefois, avant de pouvoir écarter complètement cette hypothèse, il est essentiel d'analyser l'expression de Sf1 sur des gonades isolées avant le stade 55. Pour ce faire, l'utilisation d'autres techniques comme l'hybridation *in situ* ou l'hybridation *in toto* sur des larves au cours de la TSP permettront de répondre à ce point.

Si l'augmentation du niveau de transcrits Sf1 dans les gonades $ZW^{20}$ débute réellement au stade 55, alors Sf1 pourrait être régulé par les œstrogènes comme chez la tortue *Trachemys scripta* (Fleming A. et Crews D., 2001). L'influence des œstrogènes sur le niveau des transcrits Sf1 n'a pas encore été analysée chez le pleurodèle. Cette étude est prévue à court terme par des traitements avec des œstrogènes de larves ZZ prises au stade 55. Pour ce faire, des traitements courts de 2 à 4 jours seront effectués et le niveau de transcrits Sf1 dans les gonades isolées sera mesuré par RT-PCR semi-quantitative.

Tout comme l'aromatase, Sf1 qui augmente au cours de la différenciation ovarienne, pourrait aussi constituer une cible de la température. Ainsi, il est possible que la température d'élevage module le niveau d'expression de Sf1 comme chez la tortue *Trachemys scripta* (Fleming A. et Crews D., 2001). Les analyses d'expression ont révélé que chez le pleurodèle, le niveau de transcrits Sf1 diminue dans les gonades isolées de larves $ZW^{32}$ au même niveau que celui des larves $ZZ^{20}$. Puisque ce résultat n'est observé qu'au stade 55, la modulation de l'expression de Sf1 semble plus être la conséquence du début de la différenciation sexuelle plutôt qu'un réel effet de la température. Afin de préciser l'influence de la température sur le niveau d'expression de Sf1, il est nécessaire d'opter pour des chauffages plus courts, de 48 heures environ, temps nécessaire pour que la machinerie transcriptionnelle soit engagée. Ces études sont en cours au laboratoire.

En outre, il semble primordial de compléter nos données sur les transcrits par une analyse d'expression de la protéine SF1 puisqu'il n'est pas exclu que des mécanismes post-transcriptionnels soient mis en jeu.

B) Expression de Sox9

Le facteur de transcription SOX9, impliqué dans la différenciation des cellules de Sertoli chez les mammifères (Hanley N.A. *et al.*, 2000) a ensuite été isolé et analysé chez le pleurodèle. Les transcrits Sox9 sont aussi détectés avant l'aromatase, dès le stade 42 dans les complexes gonades-mésonéphros mâles et femelles (Fig.49). Ils sont ensuite observés à tous les autres stades de la TSP mais ne présentent pas de différence significative entre les individus mâles et femelles au moment de la différenciation sexuelle. Cependant, comme pour Sf1, toutes les extractions avant le stade 55 ont été réalisées sur des ensembles gonades-mésonéphros laissant supposer que l'expression importante de Sox9 dans le mésonéphros pourrait masquer une éventuelle différence dans les gonades. A l'heure actuelle, il ne nous est donc pas possible de conclure sur ce qui se passe au cours de la TSP. Néanmoins, en l'absence du mésonéphros au stade 55, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les gonades mâles et femelles, malgré une «tendance» en faveur des mâles. Toutefois, il est possible que les protéines SOX9 présentent une localisation intra-cellulaire différente entre les gonades mâles et femelles. Effectivement, chez l'homme et la souris, la protéine SOX9 est transloquée du cytoplasme vers le noyau dans l'embryon mâle tandis qu'elle est cytoplasmique chez la femelle (Morais da Silva S. *et al.*, 1996; De Santa Barbara P. *et al.*, 2000). La présence de

différents signaux de localisation nucléaire nNLS et cNLS ainsi qu'un signal d'export nucléaire (NES) ont été décrits (Preiss S. *et al.*, 2001; Argentaro A. *et al.*, 2003; Gasca S. *et al.*, 2002). La comparaison de la séquence protéique SOX9 du pleurodèle avec celle d'autres espèces montre que les différents signaux de transport sont bien conservés chez notre modèle. Afin de pouvoir conclure sur le rôle de SOX9 dans la différenciation testiculaire chez notre modèle, il est essentiel de définir sa localisation par immunohistologie au cours du développement. Actuellement, une protéine recombinante SOX9 a été produite au laboratoire dans le but d'obtenir les anticorps nécessaires à cette étude (non publié). En outre, nous pouvons envisager qu'une autre protéine SOX pourrait être impliquée au cours de la différenciation testiculaire chez le pleurodèle. Effectivement, Sox8, un gène proche de Sox9, est exprimé au cours de la différenciation sexuelle chez la souris (Takada S. et Koopman P., 2003). La recherche d'autres protéines SOX qui pourraient exercer des fonctions redondantes avec SOX9 est à envisager chez le pleurodèle.

Sox9 ne semble pas être une cible de la température puisqu'aucune différence significative au niveau des transcrits n'a été détectée entre les larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ et $ZW^{32}$. Néanmoins, la présence d'un domaine de liaison conservé pour la protéine HSP70 au sein de la protéine SOX9 du pleurodèle suggère une interaction possible HSP70-SOX9 lors de l'inversion sexuelle induite par la température. Ce type d'interaction a déjà été mis en évidence dans des lignées cellulaires testiculaires et chondrocytaires de mammifères (Marshall O.J. et Harley V.R., 2001). Chez le pleurodèle, la protéine HSP70 est induite par la température et le niveau de protéine reste élevé pendant toute la période du chauffage des larves ZW à 32°C (résultats non publiés). Il est possible que cette interaction SOX9-HSP70 puisse modifier la différenciation gonadique lors du chauffage des larves ZW à 32°C puisque les messagers Sox9 et la protéine HSP70 sont présents. Actuellement, la possibilité d'une telle interaction est en cours d'étude.

C) Expression de Dmrt1

DMRT1, un facteur de transcription essentiel dans la différenciation testiculaire, conservé chez les vertébrés, a aussi été isolé chez le pleurodèle. L'analyse de la distribution de ses messagers dans les différents tissus adultes du pleurodèle montre une expression spécifique du testicule, en accord avec ce qui a été décrit chez les autres espèces. Au cours du développement, les transcrits Dmrt1 sont détectés très tôt, dès le

début de la TSP, chez les larves ZZ et ZW. Cependant, contrairement aux autres modèles, le niveau des transcrits Dmrt1 devient significativement plus important dans les gonades des larves femelles par rapport à celles des larves mâles à partir du stade 55. Ce profil est maintenu jusqu'à la métamorphose, au stade 56, avant de s'éteindre dans l'ovaire juvénile. D'après ces résultats, Dmrt1 semble avoir gardé une fonction dans le testicule adulte mais au cours de la différenciation gonadique, le profil d'expression laisse supposer qu'il est impliqué dans le développement ovarien. Toutefois, les preuves ne sont pas suffisantes pour affirmer un rôle de Dmrt1 au cours de la différenciation femelle chez le pleurodèle. Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier que les messagers détectés dans les complexes gonades-mésonéphros par RT-PCR sont bien codants. Effectivement, chez la souris, il a été démontré que Dmrt1 est transcrit mais pas traduit dans les cellules germinales du testicule fœtal (Raymond C.S. *et al.*, 2000). Le même phénomène a aussi été décrit pour le gène Foxl2 (Cocquet J. *et al.*, 2002). Il est également important que l'on détermine la localisation cellulaire des messagers ainsi que des protéines DMRT1 au cours de la différenciation sexuelle dans les gonades de larves ZZ et ZW. Chez le lézard *Calotes versicolor*, des transcrits Dmrt1 ont été observés dans les cellules germinales mâles et femelles et sont présumés intervenir dans la gamétogenèse (Sreenivasulu K. *et al.*, 2002). Pour le moment, ce travail n'a pu être effectué par manque d'anticorps anti-DMRT1 de pleurodèle. En outre, des messagers incomplets susceptibles de produire des isoformes tronquées de la protéine DMRT1 ont été isolés. Afin de confirmer que les précédents produits amplifiés par PCR correspondent bien au gène Dmrt1, les deux isoformes tronquées ainsi que l'isoforme complète ont été vérifiées par séquençage. Une variation dans le niveau des transcrits de ces différentes isoformes pourrait expliquer l'augmentation de Dmrt1 au cours de la différenciation ovarienne. Cependant, le niveau des différents transcrits ne semble pas présenter de variations entre les sexes. Il est aussi possible que d'autres protéines à domaine DM aient été recrutées pour participer à la différenciation sexuelle chez le pleurodèle. En effet, chez le tilapia, un gène DMO, proche de DMRT1 est spécifique de l'ovaire (Guan G. *et al.*, 2000). Chez la souris, sept gènes (Dmrt1-7) ont été isolés dont trois qui sont exprimés en plus de Dmrt1 durant la différenciation gonadique : Dmrt4 identique dans les deux sexes, Dmrt3 plus fort chez les embryons mâles et Dmrt7 plus fort chez les embryons femelles (Kim S. *et al.*, 2003). La recherche d'autres protéines à domaine DM chez le pleurodèle est à considérer.

En ce qui concerne l'effet de la température, les résultats montrent que le profil d'expression des larves $ZW^{32}$ est comparable à celui des larves $ZZ^{20}$, comme cela a été

observé pour Sf1. Cela confirme bien que le niveau de transcrits est plus faible au cours de la différenciation mâle par rapport à la différenciation femelle.

D) Recherche d'une cible de la température

La différenciation testiculaire induite par le chauffage des larves ZW à 32°C pendant toute la période thermosensible est confirmée au niveau moléculaire puisque les profils d'expressions pour les différents gènes étudiés, aromatase, Sf1, Sox9 et Dmrt1 sont similaires à celui des mâles $ZZ^{20}$.

La température semble plutôt agir indirectement sur les gènes étudiés, aromatase, Sf1, Sox9 et Dmrt1, puisque les différences observées entre les larves $ZW^{32}$ et $ZW^{20}$ surviennent assez tardivement, au stade 54 ou 55. Afin de rechercher un facteur plus précoce impliqué dans le processus d'inversion sexuelle sous l'effet de la température, nous avons réalisé une banque différentielle à l'aide du kit (PCR-Select$^{TM}$ cDNA substraction kit, Clontech). Pour ce faire, les messagers de larves ZW ont été prélevés au stade 52, avant le début de la différenciation gonadique et au moment où il a été démontré que l'activité aromatase augmente dans les gonades femelles. Au cours de ce travail, le résultat des deux soustractions a donné de nombreux clones dont l'analyse n'a pu être qu'entamée. Néanmoins, les premiers résultats sont encourageants puisque les clones isolés correspondent à des ARNm et que les différentes amorces utilisées au cours du protocole sont retrouvées. Il est dommage qu'aucun des trois clones isolés n'ait pu être identifié. Toutefois, l'analyse de la banque continue au laboratoire et nous espérons aboutir à l'identification d'un gène différentiellement régulé par la température lors de l'inversion sexuelle.

## II) Le cerveau n'est pas un site de réponse à la température chez notre modèle

Puisque l'augmentation de l'expression ou de l'activité aromatase gonadique n'est détectée qu'à la fin de la TSP, le cerveau a été supposé jouer un rôle de relais chez notre modèle comme cela a été supposé chez les tortues *Malaclemys terrapin* et *Trachemys scripta* (Jeyasuria P. et Place A.R., 1998; Willingham E. *et al.*, 2000). Cependant, les études effectuées au cours du développement n'ont révélé aucune différence ni pour l'activité de l'aromatase, ni pour son expression entre les cerveaux de larves $ZZ^{20}$, $ZW^{20}$ ou $ZW^{32}$, excluant l'aromatase comme cible de la température dans les cerveaux larvaires. La

même analyse a été effectuée pour le gène Sf1. Comme pour l'aromatase, son expression cérébrale n'est pas modifiée au cours de la différenciation sexuelle quels que soient le stade et le sexe des larves. Par conséquent, le cerveau ne semble pas être un site relais contrôlant la différenciation gonadique chez notre modèle au regard des résultats obtenus avec les gènes Sf1 et aromatase. Pour confirmer cela, l'étude d'un certains nombres de gènes sera effectuée sur des complexes gonades-mésonéphros en culture, hors de toute influence d'autres organes stéroïdogéniques, comme le cerveau.

## III) Perspectives

### 1) Expression des différents gènes au cours de la différenciation gonadique

Au terme de ce travail, plusieurs gènes ont été isolés chez le pleurodèle et l'étude de leur implication dans la différenciation mâle ou femelle a été amorcée par l'analyse de leur profil d'expression par RT-PCR semi-quantitative. Cependant, cette technique a révélé de nombreuses limites avec notamment deux problèmes majeurs.

Le premier concerne la séparation des complexes gonades-mésonéphros. Effectivement, nous n'avons pu isoler les gonades qu'à partir du stade 55. Avant ce stade, toutes les analyses ont été effectuées sur des ensembles gonades-mésonéphros ce qui pose problème lorsque les gènes sont aussi exprimés dans le mésonéphros comme Sox9 et Sf1. Aussi, l'amélioration des techniques de dissection est à envisager de façon à éviter tous les problèmes liés à l'éventuelle influence du mésonéphros sur les résultats de RT-PCR. La mise au point d'autres techniques permettant de pallier le problème du mésonéphros par RT-PCR pour les gènes Sox9 et Sf1 a déjà été envisagée. Actuellement, des études par hybridation *in situ* sont en cours en collaboration avec le docteur Duterque de l'Institut de Biologie de Lille (UMR 8526 CNRS).

L'autre problème est lié à l'hétérogénéité du développement des larves. La table de développement définie par Gallien et Durocher est fiable jusqu'au stade 52. Cependant après ce stade, les critères utilisés pour caractériser les stades larvaires ne sont plus assez précis car le temps écoulé entre deux stades est long et le développement des larves très hétérogène. Par conséquent, il serait nécessaire de définir de nouveaux critères afin de cibler plus précisément chaque étape du développement. Par exemple, en plus des critères morphologiques, l'ajout du facteur temps permettrait de pallier ces variations.

Par conséquent, si la technique de RT-PCR semi-quantitative a permis d'aborder le profil d'expression des différents gènes isolés, l'utilisation d'autres techniques comme

l'hybridation *in situ* ainsi que l'hybridation *in toto* permettront de compléter les résultats obtenus et de conclure quant à la distribution cellulaire et subcellulaire des messagers, notamment pour Sf1 et Sox9.

Les analyses d'expression et de localisation protéique pourront probablement expliquer les résultats observés par RT-PCR, particulièrement pour Sox9. Cependant, le problème majeur chez notre modèle est le manque d'anticorps disponibles dans le commerce. Pour la protéine SF1, l'immunsérum utilisé par Mayer *et al.* (2002) sur la grenouille *Rana Catesbeiana* a été testé chez notre modèle. Malgré de nombreux essais, aucun signal n'a pu être obtenu présumant que ces anticorps ne reconnaissent pas la protéine SF1 du pleurodèle. Pour pallier ce manque d'anticorps, la production de protéines recombinantes ou la synthèse de peptides ont été entreprises au laboratoire.

### 2) Recherche d'un facteur thermosensible

La recherche d'un facteur thermosensible impliqué dans l'inversion du sexe reste un point important à élucider. Pour le moment, aucun des gènes précédemment étudiés ne semble être influencé directement par la température. Toutefois, la banque différentielle n'a pas été complètement analysée et la possibilité de mettre en évidence un facteur thermosensible semble prometteuse. Par conséquent, au regard des premiers résultats obtenus, l'analyse de la banque présente un intérêt et se poursuit actuellement au laboratoire.

Toutefois, il est possible qu'une interaction telle que HSP70-SOX9 puisse exister chez le pleurodèle et modifier la différenciation gonadique des larves $ZW^{32}$. Une étude plus complète comprendra un suivi plus précis de l'expression de HSP70 ainsi que sa localisation cellulaire. Nous disposons d'anticorps anti-HSP70 de pleurodèle et nous devrions obtenir rapidement des anticorps anti-SOX9 qui devraient nous permettre de savoir si SOX9 et HSP70 sont co-localisés. La possible interaction entre ces deux protéines est actuellement en cours d'étude *in vitro*.

### 3) Mise au point d'un modèle *in vitro*

Jusqu'à présent, toutes les études ont été effectuées *in vivo* puisqu'aucun modèle *in vitro* n'a été mis au point chez le pleurodèle. Actuellement, la réalisation de cultures organotypiques a débuté au laboratoire. Grâce à ces cultures de complexes gonades-

mésonéphros ou de gonades isolées, l'influence de la température mais aussi celle de nombreuses hormones pourront être directement testées au cours de la différenciation gonadique. En outre, cela nous permettra de confirmer que le cerveau n'intervient pas au cours de la différenciation sexuelle. Les premiers essais de culture ont été effectués sur des ensembles gonades-mésonéphros. Ils ont été mis en culture pendant 48 heures soit à 20°C, soit à 32°C, puis ils ont été examinés par la mesure de l'activité aromatase, mais aussi par analyse de l'expression des gènes aromatase et Sf1 par RT-PCR semi-quantitative. Pour le moment, les études réalisées nous permettent de progresser sur les conditions et la mise au point des cultures *in vitro*.

### 4) Etude fonctionnelle des différents gènes

Les études fonctionnelles de ces gènes concernent une perspective à plus long terme. Pour une telle analyse, la technique de l'interférence ARN semble être la plus appropriée puisqu'il est impossible d'espérer réaliser un knock-out chez le pleurodèle à cause de la répétition importante de son ADN. Une construction en tête bêche, permettant de conduire à la formation d'ARN replié en épingle à cheveux, a été effectuée pour le gène de l'aromatase au laboratoire. Un premier essai d'injection de cet ARN double brin par électroporation dans des embryons de pleurodèle au stade gastrula, neurula et bourgeon caudal a été réalisé. Les premiers résultats ont révélé que cette injection n'avait pas d'influence sur le développement embryonnaire et larvaire. Si un modèle de différenciation gonadique *in vitro* était disponible, l'approche par interférence ARN serait applicable aux organes isolés.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


Achermann J.C., Ito M., Ito M., Hindmarsh P.C., Jameson J.L. 1999. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat.Genet.* 22 : 125-126.

Achermann J.C., Meeks J.J., Jameson J.L. 2001. Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. *Mol.Cell Endocrinol.* 185 : 17-25.

Adams I.R., McLaren A. 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development.* 129 : 1155-1164.

Adham I.M., Burkhardt E., Benahmed M., Engel W. 1993. Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J.Biol.Chem.* 268 : 26668-26672.

Afonso L.O., Wassermann G.J., Terezinha de Oliveira.R. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J.Exp.Zool.* 290 : 177-181.

Agate R.J., Perlman W.R., Arnold A.P. 2002. Cloning and expression of zebra finch (*Taeniopygia guttata*) steroidogenic factor 1: overlap with hypothalamic but not with telencephalic aromatase. *Biol.Reprod.* 66 : 1127-1133.

Albrecht K.H., Capel B., Washburn L.L., Eicher E.M. 2000. Defective mesonephric cell migration is associated with abnormal testis cord development in C57BL/6J XY (*Mus domesticus*) mice. *Dev.Biol.* 225 : 26-36.

Albrecht K.H., Eicher E.M. 2001. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev.Biol.* 240 : 92-107.

Altschul, Stephen F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25 : 3389-3402.

Amarneh B., Corbin C.J., Peterson J.A., Simpson E.R., Graham-Lorence S. 1993. Functional domains of human aromatase cytochrome P450 characterized by linear alignment and site-directed mutagenesis. *Mol.Endocrinol.* 7 : 1617-1624.

Andrews J.E., Smith C.A., Sinclair A.H. 1997. Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen.Comp Endocrinol.* 108 : 182-190.

Anttonen M., Ketola I., Parviainen H., Pusa A.K., Heikinheimo M. 2003. FOG-2 and GATA-4 are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression. *Biol.Reprod.* 68 : 1333-1340.

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.

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

Argentaro A., Sim H., Kelly S., Preiss S., Clayton A., Jans D.A., Harley V.R. 2003. A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J.Biol.Chem.* 278 : 33839-33847.

Armstrong J.F., Pritchard-Jones K., Bickmore W.A., Hastie N.D., Bard J.B. 1993. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech.Dev.* 40 : 85-97.

Bagheri-Fam S., Ferraz C., Demaille J., Scherer G., Pfeifer D. 2001. Comparative genomics of the SOX9 region in human and *Fugu rubripes*: conservation of short regulatory sequence elements within large intergenic regions. *Genomics.* 78 : 73-82.

Balthazart J. 1997. Steroid control and sexual differentiation of brain aromatase. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 61 : 323-339.

Balthazart J., Baillien M., Ball G.F. 2001. Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 79 : 261-277.

Balthazart J., Baillien M., Charlier T.D., Ball G.F. 2003. Calcium-dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail. *Eur.J.Neurosci.* 17 : 1591-1606.

Barbara P.S., Moniot B., Poulat F., Boizet B., Berta P. 1998. Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-mullerian hormone receptor. *J.Biol.Chem.* 273 : 29654-29660.

Bardoni B., Zanaria E., Guioli S., Floridia G., Worley K.C., Tonini G., Ferrante E., Chiumello G., McCabe E.R., Fraccaro M. 1994. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat.Genet.* 7 : 497-501.

Barnes J.D., Crosby J.L., Jones C.M., Wright C.V., Hogan B.L. 1994. Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of Xenopus Xlim-1, suggests a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis. *Dev.Biol.* 161 : 168-178.

Baroiller J.F., Chourrout D., Fostier A., Jalabert B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J.Exp.Zool.* 273 : 216-223.

Baroiller J.F., D'Cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* 130 : 399-409.

Baroiller J.F., Toguyeni A. 1995. Comparative effects of a natural androgen, 11 β-hydroxy-androstenedione and a synthetic androgen, 17 alpha-methyltes tosterone on the sex ratios of *Oreochromis niloticus*. Edition : R.V.S. Pullin J., Lazard M., Legendre J.B., Amon Kothias, Pauly D. *The third International Symposium on Tilapia in aquaculture*. 7p.

Baumstark A., Akhverdyan M., Schulze A., Reisert I., Vogel W., Just W. 2001. Exclusion of SOX9 as the testis determining factor in *Ellobius lutescens*: evidence for another testis determining gene besides SRY and SOX9. *Mol.Genet.Metab.* 72 : 61-66.

Beau C., Vivian N., Munsterberg A., Dresser D.W., Lovell-Badge R., Guerrier D. 2001. In vivo analysis of the regulation of the anti-Mullerian hormone, as a marker of Sertoli cell differentiation during testicular development, reveals a multi-step process. *Mol.Reprod.Dev.* 59 : 256-264.

Beck A.R., Miller I.J., Anderson P., Streuli M. 1998. RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95 : 2331-2336.

Behringer R.R., Finegold M.J., Cate R.L. 1994. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell.* 79 : 415-425.

Belaid B., Richard-Mercier N., Pieau C., Dorizzi M. 2001. Sex reversal and aromatase in the European pond turtle: treatment with letrozole after the thermosensitive period for sex determination. *J.Exp.Zool.* 290 : 490-497.

Belville C., Josso N., Picard J.Y. 1999. Persistence of Mullerian derivatives in males. *Am.J.Med.Genet.* 89 : 218-223.

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.

Bergstrom D.E., Young M., Albrecht K.H., Eicher E.M. 2000. Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis.* 28 : 111-124.

Bernard P., Tang P., Liu S., Dewing P., Harley V.R., Vilain E. 2003. Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum.Mol.Genet.* 12 : 1755-1765.

Bershtein L.M. 1997. Molecular-genetic aspects of estrogen production. Aromatase gene. *Mol.Biol.(Mosk).* 31 : 773-777.

Berta P., Hawkins J.R., Sinclair A.H., Taylor A., Griffiths B.L., Goodfellow P.N., Fellous M. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature.* 348 : 448-450.

Birk O.S., Casiano D.E., Wassif C.A., Cogliati T., Zhao L., Zhao Y., Grinberg A., Huang S., Kreidberg J.A., Parker K.L., Porter F.D., Westphal H. 2000. The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature.* 403 : 909-913.

Bishop C.E., Whitworth D.J., Qin Y., Agoulnik A.I., Agoulnik I.U., Harrison W.R., Behringer R.R., Overbeek P.A. 2000. A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat.Genet.* 26 : 490-494.

Bitgood M.J., Shen L., McMahon A.P. 1996. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline.

*Curr.Biol.* 6 : 298-304.

Blom N., Gammeltoft S., Brunak S. 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J.Mol.Biol.* 294 (5) : 1351-1362.

Bogatcheva N.V., Truong A., Feng S., Engel W., Adham I.M., Agoulnik A.I. 2003. GREAT/LGR8 is the only receptor for insulin-like 3 peptide. *Mol.Endocrinol.* 17 : 2639-2646.

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.

Borg B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp.Biochem.Physiol.* 1096 : 219-245.

Bottjer S.W., Glaessner S.L., Arnold A.P. 1985. Ontogeny of brain nuclei controlling song learning and behavior in zebra finches. *J.Neurosci.* 5 : 1556-1562.

Bowles J., Cooper L., Berkman J., Koopman P. 1999. Sry requires a CAG repeat domain for male sex determination in Mus musculus. *Nat.Genet.* 22 : 405-408.

Bowles J., Bullejos M., Koopman P. 2000. A subtractive gene expression screen suggests a role for vanin-1 in testis development in mice. *Genesis.* 27 : 124-135.

Brennan J., Karl J., Capel B. 2002. Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Dev.Biol.* 244 : 418-428.

Brennan J., Tilmann C., Capel B. 2003. Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev.* 17 : 800-810.

Brinkmann A.O. 2001. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol.Cell.Endocrinol.* 179 : 105-109.

Britt K.L., Drummond A.E., Cox V.A., Dyson M., Wreford N.G., Jones M.E., Simpson E.R., Findlay J.K. 2000. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology.* 141 : 2614-2623.

Britt K.L., Drummond A.E., Dyson M., Wreford N.G., Jones M.E., Simpson E.R., Findlay J.K. 2001. The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 79 : 181-185.

Bruening W., Moffett P., Chia S., Heinrich G., Pelletier J. 1996. Identification of nuclear localization signals within the zinc fingers of the WT1 tumor suppressor gene product. *FEBS Lett.* 393 : 41-47.

Brunner B., Hornung U., Shan Z., Nanda I., Kondo M., Zend-Ajusch E., Haaf T., Ropers H.H., Shima A., Schmid M., Kalscheuer V.M., Schartl M. 2001. Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1. *Genomics.* 77 : 8-17.

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

Buehr M., Petzoldt U. 1974. Gonad size and sex differentiation in rabbit embryos. *Verh.Anat.Ges.* 68 : 163-167.

Bull J.J. 1980. Sex determination in reptiles. *Qua.Rev.Biol.* 55 : 3-21.

Bullejos M., Koopman P. 2001. Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev.Dyn.* 221 : 201-205.

Burgoyne P.S., Buehr M., Koopman P., Rossant J., McLaren A. 1988. Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX----XY chimaeric mouse testes. *Development.* 102 : 443-450.

Burgoyne P., Palmer S. Cellular basis of sex determination and sex reversal in mammals. Gonadal development and function. New York : Hillier SG. 1993. 12p. (Collection Raven Press).

Burns R.K. 1955. Experimental reversal of sex in the gonads of the opossum, *Didelphis virginiana. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 41 : 669-676.

Call K.M., Glaser T., Ito C.Y., Buckler A.J., Pelletier J., Haber D.A., Rose E.A., Kral A., Yeger H., Lewis W.H. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* 60 : 509-520.

Cameron F.J., Sinclair A.H. 1997. Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum.Mutat.* 9 : 388-395.

Capel B., Albrecht K.H., Washburn L.L., Eicher E.M. 1999. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech.Dev.* 84 : 127-131.

Chang X.T., Kobayashi T., Kajiura H., Nakamura M., Nagahama Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *J.Mol.Endocrinol.* 18 : 57-66.

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.Part A Comp Exp.Biol.* 296 : 46-55.

Charnier M. 1966. Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae, Lacertilia) embryo. *C.R.Seances Soc.Biol.Fil.* 160 : 620-622.

Chen S.A., Besman M.J., Sparkes R.S., Zollman S., Klisak I., Mohandas T., Hall P.F., Shively J.E. 1988. Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA.* 7 : 27-38.

Chiang E.F., Pai C.I., Wyatt M., Yan Y.L., Postlethwait J., Chung B. 2001a. Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev.Biol.* 231 : 149-163.

Chiang E.F., Yan Y.L., Guiguen Y., Postlethwait J., Chung B. 2001b. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol.Biol.Evol.* 18 : 542-550.

Clepet C., Schafer A.J., Sinclair A.H., Palmer M.S., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. 1993. The human SRY transcript. *Hum.Mol.Genet.* 2 : 2007-2012.

Cocquet J., Pailhoux E., Jaubert F., Servel N., Xia X., Pannetier M., De Baere E., Messiaen L., Cotinot C., Fellous M., Veitia R.A. 2002. Evolution and expression of FOXL2. *J.Med.Genet.* 39 : 916-921.

Collenot A. 1973. Obtaining, by the method of grafts of embryonic gonads, a female descended from a unisexual female, in the triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Experientia.* 29 : 885-887.

Collenot A., Durand D., Lauthier M., Dorazi R., Lacroix J.C., Dournon C. 1994. Spontaneous sex reversal in *Pleurodeles waltl* (urodele, amphibia) : analysis of its inheritance. *Genet.Res.Camb.* 64 : 43-50.

Collenot A., Gounon P., Collenot G. 1977. Aspects récents de l'étude de la différenciation sexuelle des amphibiens. Etude de l'effet free-martin chez le Triton Pleurodèle. *Mem.Soc.Zool.France.* 41 : 31-42.

Collenot G., Collenot A. 1977. L'activité 3 β-hydroxystéroïde déshydrogénasique dans les gonades en différenciation de *Pleurodeles waltlii* (amphibien; urodèle); visualisation sur coupes sériées à l'aide d'une nouvelle technique histochimique. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 42 : 29-42.

Collignon J., Sockanathan S., Hacker A., Cohen-Tannoudji M., Norris D., Rastan S., Stevanovic M., Goodfellow P.N., Lovell-Badge R. 1996. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development.* 122 : 509-520.

Colvin J.S., Green R.P., Schmahl J., Capel B., Ornitz D.M. 2001. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell.* 104 : 875-889.

Conover D.O., Kynard B.E. 1981. Environmental sex determination : interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* . 213 : 577-579.

Corbin C.J., Graham-Lorence S., McPhaul M., Mason J.I., Mendelson C.R., Simpson E.R. 1988. Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85 : 8948-8952.

Corbin C.J., Mapes S.M., Marcos J., Shackleton C.H., Morrow D., Safe S., Wise T., Ford J.J., Conley A.J. 2004.

Paralogues of porcine aromatase cytochrome P450 : a novel hydroxylase activity is associated with the survival of a duplicated gene. *Endocrinology*. 145 (5) : 2157-2164.

Couse J.F., Hewitt S.C., Bunch D.O., Sar M., Walker V.R., Davis B.J., Korach K.S. 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*. 286 : 2328-2331.

Coveney D., Shaw G., Renfree M.B. 2001. Estrogen-induced gonadal sex reversal in the tammar wallaby. *Biol.Reprod.* 65 : 613-621.

Crawford P.A., Dorn C., Sadovsky Y., Milbrandt J. 1998. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol.Cell Biol.* 18 : 2949-2956.

Crews D., Bergeron J.M. 1994. Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *J.Endocrinol.* 143 : 279-289.

Crews D., Bergeron J.M., Bull J.J., Flores D., Tousignant A., Skipper J.K., Wibbels T. 1994. Temperature-dependent sex determination in reptiles: proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Dev.Genet.* 15 : 297-312.

Crews D., Cantu A.R., Bergeron J.M. 1996. Temperature and non-aromatizable androgens: a common pathway in male sex determination in a turtle with temperature-dependent sex determination? *J.Endocrinol.* 149 : 457-463.

Crews D., Fleming A., Willingham E., Baldwin R., Skipper J.K. 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 M.S., 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.

D'Cotta H., Fostier A., Guiguen Y., Govoroun M., Baroiller J.F. 2001a. Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J.Exp.Zool.* 290 : 574-585.

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

Dale T.C. 1998. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem.J.* 329 ( Pt 2) : 209-223.

Dalla V.L., Lunardi L., Colombo L., Belvedere P. 2002. European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 80 : 25-34.

De Baere E., Dixon M.J., Small K.W., Jabs E.W., Leroy B.P., Devriendt K., Gillerot Y., Mortier G., Meire F., Van Maldergem L., Courtens W., Hjalgrim H., Huang S., Liebaers I., Van Regemorter N., Touraine P., Praphanphoj V., Verloes A., Udar N., Yellore V., Chalukya M., Yelchits S., De Paepe A., Kuttenn F., Fellous M., Veitia R., Messiaen L. 2001. Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype--phenotype correlation. *Hum.Mol.Genet.* 10 : 1591-1600.

De Grandi A., Calvari V., Bertini V., Bulfone A., Peverali G., Camerino G., Borsani G., Guioli S. 2000. The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech.Dev.* 90 : 323-326.

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

De Santa Barbara P., Moniot B., Poulat F., Berta P. 2000. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev.Dyn.* 217 : 293-298.

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.

Dorizzi M., Mignot T.M., Guichard A., Desvages G., Pieau C. 1991. Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation*. 47 : 9-17.

Dorizzi M., Richard-Mercier N., Desvages G., Girondot M., Pieau C. 1994. Masculinization of gonads by aromatase

inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation.* 58 : 1-8.

Dournon C., Guillet F., Boucher D., Lacroix J.C. 1984. Cytogenetic and genetic evidence of male sexual inversion by heat treatment in the newt *Pleurodeles poireti. Chromosoma.* 90 : 261-264.

Dournon C., Houillon C. 1984. Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien urodèle *Pleurodeles waltl* Michah. *Reprod.Nutr.Dev.* 24 : 361-378.

Dournon C., Houillon C. 1985. Thermosensibilité de la defferentiation sexuelle chez l'A.U.P.W.M. 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.

Dournon C., Demassieux C., Durand D., Lesimple M. 1989. Primordial germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl:* genetic control before gonadal differentiation. *Int.J.Dev.Biol.* 33 : 477-485.

Dressler G.R., Douglass E.C. 1992. Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89 : 1179-1183.

Du X., Hublitz P., Gunther T., Wilhelm D., Englert C., Schule R. 2002. The LIM-only coactivator FHL2 modulates WT1 transcriptional activity during gonadal differentiation. *Biochim.Biophys.Acta.* 1577 : 93-101.

Dubin R.A., Ostrer H. 1994. Sry is a transcriptional activator. *Mol.Endocrinol.* 8 : 1182-1192.

Dupont S., Krust A., Gansmuller A., Dierich A., Chambon P., Mark M. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development.* 127 : 4277-4291.

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.

Eddy E.M., Washburn T.F., Bunch D.O., Goulding E.H., Gladen B.C., Lubahn D.B., Korach K.S. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology.* 137 : 4796-4805.

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

Ellegren H. 2001. Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W? *EMBO Rep.* 2 : 192-196.

Eusebe D., di Clemente N., Rey R., Pieau C., Vigier B., Josso N., Picard J.Y. 1996. Cloning and expression of the chick anti-Mullerian hormone gene. *J.Biol.Chem.* 271 : 4798-4804.

Ferrari S., Harley V.R., Pontiggia A., Goodfellow P.N., Lovell-Badge R., Bianchi M.E. 1992. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* 11 : 4497-4506.

Ferrier V., Gasser F., Jaylet A., Cayrol C. 1983. A genetic study of various enzyme polymorphisms in *Pleurodeles waltlii* (Urodele Amphibian). II. Peptidases: demonstration of sex linkage. *Biochem.Genet.* 21 : 535-549.

Fisher C.R., Graves K.H., Parlow A.F., Simpson E.R. 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95 : 6965-6970.

Flejter W.L., Fergestad J., Gorski J., Varvill T., Chandrasekharappa S. 1998. A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *Am.J.Hum.Genet.* 63 : 794-802.

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 J.K., Crews D. 1999. Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen.Comp Endocrinol.* 116 : 336-346.

Forlano P.M., Deitcher D.L., Myers D.A., Bass A.H. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J.Neurosci.* 21 : 8943-8955.

Forwood J.K., Harley V., Jans D.A. 2001. The C-terminal nuclear localization signal of the sex-determining region Y (SRY) high mobility group domain mediates nuclear import through importin beta 1. *J.Biol.Chem.* 276 : 46575-

46582.

Foster J.W., Dominguez-Steglich M.A., Guioli S., Kowk G., Weller P.A., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I.D., Goodfellow P.N. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 372 : 525-530.

Foster J.W., Graves J.A. 1994. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91 : 1927-1931.

Frojdman K., Harley V.R., Pelliniemi L.J. 2000. Sox9 protein in rat sertoli cells is age and stage dependent. *Histochem.Cell Biol.* 113(1) : 31-36.

Fujii T., Pichel J.G., Taira M., Toyama R., Dawid I.B., Westphal H. 1994. Expression patterns of the murine LIM class homeobox gene lim1 in the developing brain and excretory system. *Dev.Dyn.* 199 : 73-83.

Fusani L., Hutchison J.B., Gahr M. 2001. Testosterone regulates the activity and expression of aromatase in the canary neostriatum. *J.Neurobiol.* 49 : 1-8.

Gabriel W.N., Blumberg B., Sutton S., Place A.R., Lance V.A. 2001. Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures. *J.Exp.Zool.* 290 : 439-448.

Gallien L. 1950. Inversion du sexe (féminisation) chez l'urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah, traité par le benzoate d'oestradiol. *C.R.Acad.SC.Paris*. 231 : 919-920.

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

Gallien L. 1954b. Inversion expérimentale du sexe sous l'action des hormones sexuelles chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michach. Analyse des conséquences génétiques. *Bull.Biol.Fr.Belg.* 88 : 1-51.

Gallien L. 1962. Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. *Gen.Comp Endocrinol.* Suppl 1 : 346-355.

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

Gallien L., Labrousse M., Picheral B., Lacroix J.C. 1965. Experimental karyotype changes in a urodele amphibian (*Pleurodeles waltlii* Michach.) due to irradiation of the egg and nuclear grafting . *Rev.Suisse Zool.* 72 : 59-85.

Gallien L., Labrousse M., Lacroix J.C. 1966. Detection in mitotic chromosomes and lampbrush chromosomes of anomalies caused by irradiation of the ovum, in urodelan amphibia, *Pleurodeles waltlii* Michah. *C.R.Acad.Sci.Hebd.Seances Acad.Sci.D.* 263 : 1984-1987.

Gallien L. 1973. Différenciation et organogénèse sexuelle des métazoaires. Paris : MASSON et CIE. 250p.

Ganesh S., Raman R. 1995. Sex reversal by testosterone and not by estradiol or temperature in *Calotes versicolor*, the lizard lacking sex chromosomes. *J.Exp.Zool.* 271 : 139-144.

Gasca S., Canizares J., De Santa Barbara P., Mejean C., Poulat F., Berta P., Boizet-Bonhoure B. 2002. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99 : 11199-11204.

Gattiker A., Gasteiger E., Bairoch A. 2002. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Applied Bioinformatics*. 1 : 107-108.

Gibbons R.J., Picketts D.J., Villard L., Higgs D.R. 1995. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell*. 80 : 837-845.

Giese K., Pagel J., Grosschedl R. 1994. Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91 : 3368-3372.

Giuili G., Shen W.H., Ingraham H.A. 1997. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of

Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development.* 124 : 1799-1807.

Gnessi L., Basciani S., Mariani S., Arizzi M., Spera G., Wang C., Bondjers C., Karlsson L., Betsholtz C. 2000. Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J.Cell Biol.* 149 : 1019-1026.

Gnessi L., Emidi A., Jannini E.A., Carosa E., Maroder M., Arizzi M., Ulisse S., Spera G. 1995. Testicular development involves the spatiotemporal control of PDGFs and PDGF receptors gene expression and action. *J.Cell Biol.* 131 : 1105-1121.

Golovine K., Schwerin M., Vanselow J. 2003. Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome p450 gene (cyp19) in mouse gonads and brain. *Biol.Reprod.* 68 : 978-984.

Gonzalez A., Piferrer F. 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen.Comp Endocrinol.* 132 : 223-230.

Gorlov I.P., Kamat A., Bogatcheva N.V., Jones E., Lamb D.J., Truong A., Bishop C.E., McElreavey K., Agoulnik A.I. 2002. Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism. *Hum.Mol.Genet.* 11 : 2309-2318.

Govoroun M., McMeel O.M., D'Cotta H., Ricordel M.J., Smith T., Fostier A., Guiguen Y. 2001. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J.Exp.Zool.* 290 : 558-566.

Graddy L.G., Kowalski A.A., Simmen F.A., Davis S.L., Baumgartner W.W., Simmen R.C. 2000. Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 73 : 49-57.

Graves J.A. 1998. Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J.Exp.Zool.* 281 : 472-481.

Grimmond S., Van Hateren N., Siggers P., Arkell R., Larder R., Soares M.B., de Fatima Bonaldo M., Smith L., Tymowska-Lalanne Z., Wells C., Greenfield A. 2000. Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development. *Hum.Mol.Genet.* 9 : 1553-1560.

Guan G., Kobayashi T., Nagahama Y. 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 272 : 662-666.

Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature.* 346 : 245-250.

Gubbay J., Vivian N., Economou A., Jackson D., Goodfellow P., Lovell-Badge R. 1992. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89 : 7953-7957.

Guerriero G., Roselli C.E., Paolucci M., Botte V., Ciarcia G. 2000. Estrogen receptors and aromatase activity in the hypothalamus of the female frog, *Rana esculenta*. Fluctuations throughout the reproductive cycle. *Brain Res.* 880 : 92-101.

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

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.

Guyot R., Magre S., Leduque P., Magueresse-Battistoni B. 2003. Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) during mouse gonad development. *Dev.Dyn.* 227 : 357-366.

Haber D.A., Sohn R.L., Buckler A.J., Pelletier J., Call K.M., Housman D.E. 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88 : 9618-9622.

Hacker A., Capel B., Goodfellow P., Lovell-Badge R. 1995. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development.* 121 : 1603-1614.

Hammes A., Guo J.K., Lutsch G., Leheste J.R., Landrock D., Ziegler U., Gubler M.C., Schedl A. 2001. Two splice

variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell.* 106 : 319-329.

Hanley N.A., Ball S.G., Clement-Jones M., Hagan D.M., Strachan T., Lindsay S., Robson S., Ostrer H., Parker K.L., Wilson D.I. 1999. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech.Dev.* 87 : 175-180.

Hanley N.A., Hagan D.M., Clement-Jones M., Ball S.G., Strachan T., Salas-Cortes L., McElreavey K., Lindsay S., Robson S., Bullen P., Ostrer H., Wilson D.I. 2000. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech.Dev.* 91 : 403-407.

Haqq C.M., King C.Y., Ukiyama E., Falsafi S., Haqq T.N., Donahoe P.K., Weiss M.A. 1994. Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science.* 266 : 1494-1500.

Harley V.R., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. 1994. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res.* 22 : 1500-1501.

Harley V.R., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N., Hextall P.J. 1996. The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett.* 391 : 24-28.

Harley V.R., Clarkson M.J., Argentaro A. 2003a. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr.Rev.* 24 : 466-487.

Harley V.R., Layfield S., Mitchell C.L., Forwood J.K., John A.P., Briggs L.J., McDowall S.G., Jans D.A. 2003b. Defective importin beta recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 : 7045-7050.

Harry J.L., Koopman P., Brennan F.E., Graves J.A., Renfree M.B. 1995. Widespread expression of the testis-determining gene SRY in a marsupial. *Nat.Genet.* 11 : 347-349.

Harvey S.C., Kwon J.Y., Penman D.J. 2003. Physical mapping of the brain and ovarian aromatase genes in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by fluorescence in situ hybridization. *Anim Genet.* 34 : 62-64.

Hatano O., Takayama K., Imai T., Waterman M.R., Takakusu A., Omura T., Morohashi K. 1994. Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development.* 120 : 2787-2797.

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.U.S.A.* 97 : 10751-10756.

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

He C.L., Du J.L., Wu G.C., Lee Y.H., Sun L.T., Chang C.F. 2003. Differential Dmrt1 transcripts in gonads of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli. Cytogenet.Genome Res.* 101 : 309-313.

Hines G.A., Boots L.R., Wibbels T., Watts S.A. 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: cyprinoidei). *Gen.Comp Endocrinol.* 114 : 235-248.

Hori T., Asakawa S., Itoh Y., Shimizu N., Mizuno S. 2000. Wpkci, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination. *Mol.Biol.Cell.* 11 : 3645-3660.

Hossain A., Saunders G.F. 2003. Synergistic cooperation between the beta-catenin signaling pathway and steroidogenic factor 1 in the activation of the Mullerian inhibiting substance type II receptor. *J.Biol.Chem.* 278 : 26511-26516.

Houillon C. 1956. Recherches expérimantales sur la dissociation médullo-corticale dans l'organogenèse des gonades chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull.Biol.Fr.Belg.* 90 : 359-445.

Houillon C., Dournon C. 1986. Development of the urogenital tract in double-bodied pleurodele chimeras. Effect of

position on interactions between the genital glands of different sex. *Reprod.Nutr.Dev.* 26 : 1115-1135.

Houston C.S., Opitz J.M., Spranger J.W., Macpherson R.I., Reed M.H., Gilbert E.F., Herrmann J., Schinzel A. 1983. The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *Am.J.Med.Genet.* 15 : 3-28.

Hoyle C., Narvaez V., Alldus G., Lovell-Badge R., Swain A. 2002. Dax1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. *Mol.Endocrinol.* 16 : 747-756.

Huang B., Wang S., Ning Y., Lamb A.N., Bartley J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am.J.Med.Genet.* 87 : 349-353.

Humphrey R.R. 1945. Sex determination in Ambystomid Salamanders : a study of the progeny of females experimentally converted into males. *Am.J.Anat.* 76 : 33-66.

Hunt S.E., Mittwoch U. 1987. Y-chromosomal and other factors in the development of testis size in mice. *Genet.Res.* 50 : 205-211.

Hutchison J.B., Beyer C., Hutchison R.E., Wozniak A. 1995. Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 53 : 307-313.

Ijiri S., Berard C., Trant J.M. 2000. Characterization of gonadal and extra-gonadal forms of the cDNA encoding the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) cytochrome P450 aromatase (CYP19). *Mol.Cell Endocrinol.* 164 : 169-181.

Ijiri S., Kazeto Y., Lokman P.M., Adachi S., Yamauchi K. 2003. Characterization of a cDNA encoding P-450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development. *Gen.Comp Endocrinol.* 130 : 193-203.

Ikeda Y., Lala D.S., Luo X., Kim E., Moisan M.P., Parker K.L. 1993. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol.Endocrinol.* 7 : 852-860.

Ikeda Y., Shen W.H., Ingraham H.A., Parker K.L. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol.Endocrinol.* 8 : 654-662.

Ikeda Y., Swain A., Weber T.J., Hentges K.E., Zanaria E., Lalli E., Tamai K.T., Sassone-Corsi P., Lovell-Badge R., Camerino G., Parker K.L. 1996. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol.Endocrinol.* 10 : 1261-1272.

Imataka H., Suzuki K., Inano H., Kohmoto K., Tamaoki B. 1988. Sexual differences of steroidogenic enzymes in embryonic gonads of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen.Comp Endocrinol.* 69 : 153-162.

Imbeaud S., Faure E., Lamarre I., Mattei M.G., di Clemente N., Tizard R., Carre-Eusebe D., Belville C., Tragethon L., Tonkin C. 1995. Insensitivity to anti-mullerian hormone due to a mutation in the human anti-mullerian hormone receptor. *Nat.Genet.* 11 : 382-388.

Ion A., Telvi L., Chaussain J.L., Galacteros F., Valayer J., Fellous M., McElreavey K. 1996. A novel mutation in the putative DNA helicase XH2 is responsible for male-to-female sex reversal associated with an atypical form of the ATR-X syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 58 : 1185-1191.

Ito M., Yu R., Jameson J.L. 1997. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol.Cell Biol.* 17 : 1476-1483.

Ito M., Yu R.N., Jameson J.L. 1998. Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol.Endocrinol.* 12 : 290-301.

Jacobs E.C., Arnold A.P., Campagnoni A.T. 1997. Zebra finch estrogen receptor cDNA : cloning and mRNA expression. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 59 : 135-147.

Jager R.J., Anvret M., Hall K., Scherer G. 1990. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature.* 348 : 452-454.

Jamin S.P., Arango N.A., Mishina Y., Hanks M.C., Behringer R.R. 2002. Requirement of Bmpr1a for Mullerian duct regression during male sexual development. *Nat.Genet.* 32 : 408-410.

Jeyasuria P., Place A.R. 1997. Temperature-dependent aromatase expression in developing diamondback terrapin

(*Malaclemys terrapin*) embryos. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 61 : 415-425.

Jeyasuria P., Place A.R. 1998. Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles : a role for P450 aromatase (CYP19). *J.Exp.Zool.* 281 : 428-449.

Jordan B.K., Mohammed M., Ching S.T., Delot E., Chen X.N., Dewing P., Swain A., Rao P.N., Elejalde B.R., Vilain E. 2001. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics.* 68 : 1102-1109.

Jordan B.K., Shen J.H., Olaso R., Ingraham H.A., Vilain E. 2003. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 : 10866-10871.

Josso N., Lamarre I., Picard J.Y., Berta P., Davies N., Morichon N., Peschanski M., Jeny R. 1993. Anti-mullerian hormone in early human development. *Early Hum.Dev.* 33 : 91-99.

Jost A. 1947. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch.Anat.micr.Morph.exp.* 36 : 151-315.

Jost A. 1970. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 259 : 119-130.

Just W., Rau W., Vogel W., Akhverdian M., Fredga K., Graves J.A., Lyapunova E. 1995. Absence of Sry in species of the vole Ellobius. *Nat.Genet.* 11 : 117-118.

Kanai Y., Koopman P. 1999. Structural and functional characterization of the mouse Sox9 promoter: implications for campomelic dysplasia. *Hum.Mol.Genet.* 8 : 691-696.

Kanno Y., Tamura M., Chuma S., Sakura T., Machida T., Nakatsuji N. 1999. A cystatin-related gene, testatin/cresp, shows male-specific expression in germ and somatic cells from the initial stage of murine gonadal sex-differentiation. *Int.J.Dev.Biol.* 43 : 777-784.

Karl J., Capel B. 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev.Biol.* 203 : 323-333.

Kato J., Yamada-Mouri N., Hirata S. 1997. Structure of aromatase mRNA in the rat brain. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 61 : 381-385.

Katoh-Fukui Y., Tsuchiya R., Shiroishi T., Nakahara Y., Hashimoto N., Noguchi K., Higashinakagawa T. 1998. Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature.* 393 : 688-692.

Kawabe K., Shikayama T., Tsuboi H., Oka S., Oba K., Yanase T., Nawata H., Morohashi K. 1999. Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. *Mol.Endocrinol.* 13 : 1267-1284.

Kawano K., Miura I., Morohashi K., Takase M., Nakamura M. 1998. Molecular cloning and expression of the SF-1/Ad4BP gene in the frog, *Rana rugosa*. *Gene.* 222 : 169-176.

Kazeto Y., Ijiri S., Place A.R., Zohar Y., Trant J.M. 2001. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 288 : 503-508.

Kent J., Coriat A.M., Sharpe P.T., Hastie N.D., Van Heyningen V. 1995. The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene.* 11 : 1781-1792.

Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H., Koopman P. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* 122 : 2813-2822.

Keshet E., Lyman S.D., Williams D.E., Anderson D.M., Jenkins N.A., Copeland N.G., Parada L.F. 1991. Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J.* 10 : 2425-2435.

Kettlewell J.R., Raymond C.S., Zarkower D. 2000. Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis.* 26 : 174-178.

Kim J., Prawitt D., Bardeesy N., Torban E., Vicaner C., Goodyer P., Zabel B., Pelletier J. 1999. The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Mol.Cell Biol.* 19 : 2289-2299.

Kim S., Kettlewell J.R., Anderson R.C., Bardwell V.J., Zarkower D. 2003. Sexually dimorphic expression of multiple

doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Expr.Patterns.* 3 : 77-82.

Kishida M., Callard G.V. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology.* 142 : 740-750.

Kitano T., Takamune K., Kobayashi T., Nagahama Y., Abe S.I. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J.Mol.Endocrinol.* 23 : 167-176.

Kitano T., Takamune K., Nagahama Y., Abe S.I. 2000. Aromatase inhibitor and 17-alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol.Reprod.Dev.* 56 : 1-5.

Kobayashi A., Behringer R.R. 2003. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat.Rev.Genet.* 4 : 969-980.

Kondo M., Froschauer A., Kitano A., Nanda I., Hornung U., Volff J.N., Asakawa S., Mitani H., Naruse K., Tanaka M., Schmid M., Shimizu N., Schartl M., Shima A. 2002. Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene.* 295 : 213-222.

Kondo M., Nanda I., Hornung U., Asakawa S., Shimizu N., Mitani H., Schmid M., Shima A., Schartl M. 2003. Absence of the candidate male sex-determining gene dmrt1b(Y) of medaka from other fish species. *Curr.Biol.* 13 : 416-420.

Koopman P., Munsterberg A., Capel B., Vivian N., Lovell-Badge R. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 348 : 450-452.

Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 351 : 117-121.

Koumoundouros G., Pavlidis M., Anezaki L., Kokkari C., Sterioti A., Divanach P., Kentouri M. 2002. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. *J.Exp.Zool.* 292 : 573-579.

Krege J.H., Hodgin J.B., Couse J.F., Enmark E., Warner M., Mahler J.F., Sar M., Korach K.S., Gustafsson J.A., Smithies O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95 : 15677-15682.

Kreidberg J.A., Sariola H., Loring J.M., Maeda M., Pelletier J., Housman D., Jaenisch R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 74 : 679-691.

Kudo T., Sutou S. 1999. Structural characterization of the chicken SF-1/Ad4BP gene. *Gene.* 231 : 33-40.

Kudo T., Yamamoto H., Sato S., Sutou S. 1996. Comparison of 5' upstream regions of chicken and quail aromatase genes. *Reprod.Dev.* 42 : 101-107.

Kuiper G.G., Enmark E., Pelto-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93 : 5925-5930.

Kusz K., Kotecki M., Wojda A., Szarras-Czapnik M., Latos-Bielenska A., Warenik-Szymankiewicz A., Ruszczynska-Wolska A., Jaruzelska J. 1999. Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive X chromosome. *J.Med.Genet.* 36 : 452-456.

Kwon J.Y., Haghpanah V., Kogson-Hurtado L.M., McAndrew B.J., Penman D.J. 2000. Masculinization of genetic female nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J.Exp.Zool.* 287 : 46-53.

Kwon J.Y., McAndrew B.J., Penman D.J. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol.Reprod.Dev.* 59 : 359-370.

Lacroix J.C. 1967. Production of fertile trisomic females in the urodele amphibian, *Pleurodeles waltlii* Michah. *C.R.Acad.Sci.Hebd.Seances Acad.Sci.D.* 264 : 85-88.

Lacroix J.C. 1968. Etude descriptive des chromosomes en écouvillon dans le genre Pleurodèles. *Ann.Emb.Morph.* 1 :

179-202.

Lacroix J.C., Azzouz R., Boucher D., Abbadie C., Pyne C.K., Charlemagne J. 1985. Monoclonal antibodies to lampbrush chromosome antigens of *Pleurodeles waltlii*. *Chromosoma*. 92 : 69-80.

Lacroix J.C., Azzouz R., Simon F., Bellini M., Charlemagne J., Dournon C. 1990. Lampbrush W and Z heterochromosome characterization with a monoclonal antibody and heat-induced chromosomal markers in the newt *Pleurodeles waltl* : W chromosome plays a role in female sex determination. *Chromosoma*. 99 : 307-314.

Lala D.S., Rice D.A., Parker K.L. 1992. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor 1. *Mol.Endocrinol.* 6 : 1249-1258.

Lala D.S., Syka P.M., Lazarchik S.B., Mangelsdorf D.J., Parker K.L., Heyman R.A. 1997. Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94 : 4895-4900.

Lance V.A., Bogart M.H. 1991. Tamoxifen sex reverses alligator embryos at male producing temperature, but is an antioestrogen in female hatchlings. *Experientia*. 47 : 263-267.

Lance V.A., Bogart M.H. 1992. Disruption of ovarian development in alligator embryos treated with an aromatase inhibitor. *Gen.Comp Endocrinol.* 86 : 59-71.

Larsson S.H., Charlieu J.P., Miyagawa K., Engelkamp D., Rassoulzadegan M., Ross A., Cuzin F., Van Heyningen V., Hastie N.D. 1995. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*. 81 : 391-401.

Lauber M.E., Sarasin A., Lichtensteiger W. 1997. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 61 : 359-364.

Lee S.B., Haber D.A. 2001. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp.Cell Res.* 264 : 74-99.

Lee Y.H., Du J.L., Yueh W.S., Lin B.Y., Huang J.D., Lee C.Y., Lee M.F., Lau E.L., Lee F.Y., Morrey C., Nagahama Y., Chang C.F. 2001. Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* : a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *J.Exp.Zool.* 290 : 715-726.

Lephart E.D., Peterson K.G., Noble J.F., George F.W., McPhaul M.J. 1990. The structure of cDNA clones encoding the aromatase P-450 isolated from a rat Leydig cell tumor line demonstrates differential processing of aromatase mRNA in rat ovary and a neoplastic cell line. *Mol.Cell Endocrinol.* 70 : 31-40.

Li B., Zhang W., Chan G., Jancso-Radek A., Liu S., Weiss M.A. 2001. Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY. A clinical correlation. *J.Biol.Chem.* 276 : 46480-46484.

Li M., Zhao C., Wang Y., Zhao Z., Meng A. 2002. Zebrafish sox9b is an early neural crest marker. *Dev.Genes Evol.* 212 : 203-206.

Lillie F.R. 1916. The theory of the free-martin. *Science*. 43 : 611-

Lillie F.R. 1917. The free-martin : a study of the action of sex hormones in the foetal life of cattle. *J.Exp.Zool.* 23 : 371-452.

Lim H.N., Berkovitz G.D., Hughes I.A., Hawkins J.R. 2000. Mutation analysis of subjects with 46, XX sex reversal and 46, XY gonadal dysgenesis does not support the involvement of SOX3 in testis determination. *Hum.Genet.* 107 : 650-652.

Little M., Wells C. 1997. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum.Mutat.* 9 : 209-225.

Liu S., Govoroun M., D'Cotta H., Ricordel M.J., Lareyre J.J., McMeel O.M., Smith T., Nagahama Y., Guiguen Y. 2000. Expression of cytochrome P450 (11beta-hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 75 : 291-298.

Liu Z., Stocco D.M. 1997. Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. Endocrinology. 138 (7) : 2722-2728.

Loffler K.A., 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.

Lovell-Badge R., Canning C., Sekido R. 2002. "The genetics and biology of sex determination". Edition : Chadwick D., Goods J. John Wiley, West Sussex, U.K. 18p.

Luo X., Ikeda Y., Parker K.L. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 77 : 481-490.

Lynch J.P., Lala D.S., Peluso J.J., Luo W., Parker K.L., White B.A. 1993. Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol.Endocrinol.* 7 : 776-786.

Marchand O., Govoroun M., D'Cotta H., McMeel O., Lareyre J., Bernot A., Laudet V., Guiguen Y. 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim.Biophys.Acta.* 1493 : 180-187.

Marshall O.J., Harley V.R. 2001. Identification of an interaction between SOX9 and HSP70. *FEBS Lett.* 496 : 75-80.

Martineau J., Nordqvist K., Tilmann C., Lovell-Badge R., Capel B. 1997. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr.Biol.* 7 : 958-968.

Matsuda M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C.E., 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.

Matsuzawa-Watanabe Y., Inoue J., Semba K. 2003. Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene.* 22 : 7900-7904.

Mayer L.P., Overstreet S.L., Dyer C.A., Propper C.R. 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.

Mayer L.P., Dyer C.A., Propper C.R. 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.

Mazaud S., Oreal E., Guigon C.J., Carre-Eusebe D., Magre S. 2002. Lhx9 expression during gonadal morphogenesis as related to the state of cell differentiation. *Gene Expr.Patterns.* 2 : 373-377.

McClive P.J., Hurley T.M., Sarraj M.A., Van den Bergen J.A., Sinclair A.H. 2003. Subtractive hybridisation screen identifies sexually dimorphic gene expression in the embryonic mouse gonad. *Genesis.* 37 : 84-90.

McClive P.J., Sinclair A.H. 2003. Type II and type IX collagen transcript isoforms are expressed during mouse testis development. *Biol.Reprod.* 68 : 1742-1747.

McDowall S., Argentaro A., Ranganathan S., Weller P., Mertin S., Mansour S., Tolmie J., Harley V. 1999. Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J.Biol.Chem.* 274 : 24023-24030.

McElreavey K., Vilain E., Abbas N., Herskowitz I., Fellous M. 1993. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90 : 3368-3372.

McPhaul M.J., Noble J.F., Simpson E.R., Mendelson C.R., Wilson J.D. 1988. The expression of a functional cDNA encoding the chicken cytochrome P-450arom (aromatase) that catalyzes the formation of estrogen from androgen. *J.Biol.Chem.* 263 : 16358-16363.

Meeks J.J., Crawford S.E., Russell T.A., Morohashi K., Weiss J., Jameson J.L. 2003a. Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development.* 130 : 1029-1036.

Meeks J.J., Russell T.A., Jeffs B., Huhtaniemi I., Weiss J., Jameson J.L. 2003b. Leydig cell-specific expression of DAX1 improves fertility of the Dax1-deficient mouse. *Biol.Reprod.* 69 : 154-160.

Menuet A., Anglade I., Le Guevel R., Pellegrini E., Pakdel F., Kah O. 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. *J.Comp Neurol.* 462 : 180-193.

Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza N., Buehr M. 1993. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int.J.Dev.Biol.* 37 : 407-415.

Merchant-Larios H., Ruiz-Ramirez S., Moreno-Mendoza N., Marmolejo-Valencia A. 1997. Correlation among

thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen.Comp Endocrinol.* 107 : 373-385.

Meyers-Wallen V.N. 2003. Sry and Sox9 expression during canine gonadal sex determination assayed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol.Reprod.Dev.* 65 : 373-381.

Michael M.D., Kilgore M.W., Morohashi K., Simpson E.R. 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.

Mikamo K., Witschi E. 1963. Functional sex-reversal in genetic females of *Xenopus laevis* induced by implanted testes. *Genetics*. 48 : 1411-1421.

Miller C., Sassoon D.A. 1998. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*. 125 : 3201-3211.

Miller S.W., Hayward D.C., Bunch T.A., Miller D.J., Ball E.E., Bardwell V.J., Zarkower D., Brower D.L. 2003. A DM domain protein from a coral, *Acropora millepora*, homologous to proteins important for sex determination. *Evol.Dev.* 5 : 251-258.

Milnes M.R., Roberts R.N., Guillette L.J.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.

Mishina Y., Rey R., Finegold M.J., Matzuk M.M., Josso N., Cate R.L., Behringer R.R. 1996. Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* 10 : 2577-2587.

Mishina Y., Whitworth D.J., Racine C., Behringer R.R. 1999. High specificity of Mullerian-inhibiting substance signaling *in vivo*. *Endocrinology*. 140 : 2084-2088.

Mittwoch U. 1986. Males, females and hermaphrodites. An inaugural lecture delivered by Professor Ursula Mittwoch at University College London on 24 October 1985. *Ann.Hum.Genet.* 50 ( Pt 2) : 103-121.

Mittwoch U., Delhanty J.D., Beck F. 1969. Growth of differentiating testes and ovaries. *Nature*. 224 : 1323-1325.

Mittwoch U., Mahadevaiah S. 1980. Comparison of development of human fetal gonads and kidneys. *J.Reprod.Fertil.* 58 : 463-467.

Miyamoto N., Yoshida M., Kuratani S., Matsuo I., Aizawa S. 1997. Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development*. 124 : 1653-1664.

Miyashita K., Shimizu N., Osanai S., Miyata S. 2000. Sequence analysis and expression of the P450 aromatase and estrogen receptor genes in the Xenopus ovary. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 75 : 101-107.

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.

Mizusaki H., Kawabe K., Mukai T., Ariyoshi E., Kasahara M., Yoshioka H., Swain A., Morohashi K. 2003. Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol.Endocrinol.* 17 : 507-519.

Moniot B., Berta P., Scherer G., Sudbeck P., Poulat F. 2000. Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech.Dev.* 91 : 323-325.

Morais da Silva S., 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.

Moreno-Mendoza N., Harley V.R., Merchant-Larios H. 1999. Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at. *J.Exp.Zool.* 284 : 705-710.

Moreno-Mendoza N., Harley V.R., Merchant-Larios H. 2001. Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Dev.Biol.* 229 : 319-326.

Munsterberg A., Lovell-Badge R. 1991. Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both

male and female sexual differentiation. *Development.* 113 : 613-624.

Murdock C., Wibbels T. 2003a. Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet.Genome Res.* 101 : 302-308.

Murdock C., Wibbels T. 2003b. Cloning and expression of aromatase in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen.Comp Endocrinol.* 130 : 109-119.

Muscatelli F., Strom T.M., Walker A.P., 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.

Nachtigal M.W., Hirokawa Y., Enyeart-VanHouten D.L., Flanagan J.N., Hammer G.D., Ingraham H.A. 1998. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell.* 93 : 445-454.

Nagai K. 2001. Molecular evolution of Sry and Sox gene. *Gene.* 270 : 161-169.

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.

Nakamura M., Kobayashi T., Chang X.T., Nagahama Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J.Exp.Zool.* 281 : 362-372.

Nanda I., Shan Z., Schartl M., Burt D.W., Koehler M., Nothwang H., Grutzner F., Paton I.R., Windsor D., Dunn I., Engel W., Staeheli P., Mizuno S., Haaf T., Schmid M. 1999. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat.Genet.* 21 : 258-259.

Nanda I., Kondo M., Hornung U., Asakawa S., Winkler C., Shimizu A., Shan Z., Haaf T., Shimizu N., Shima A., Schmid M., Schartl M. 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, Oryzias latipes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99 : 11778-11783.

Nanda I., Hornung U., Kondo M., Schmid M., Schartl M. 2003. Common spontaneous sex-reversed XX males of the medaka Oryzias latipes. *Genetics.* 163 : 245-251.

Nasrin N., Buggs C., Kong X.F., Carnazza J., Goebl M., Alexander-Bridges M. 1991. DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. *Nature.* 354 : 317-320.

Nef S., Parada L.F. 1999. Cryptorchidism in mice mutant for Insl3. *Nat.Genet.* 22 : 295-299.

Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J., Vassalli J.D., Efstratiadis A., Accili D., Parada L.F. 2003. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature.* 426 : 291-295.

Ng L.J., Wheatley S., Muscat G.E., Conway-Campbell J., Bowles J., Wright E., Bell D.M., Tam P.P., Cheah K.S., Koopman P. 1997. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev.Biol.* 183 : 108-121.

Ninomiya Y., Okada M., Kotomura N., Suzuki K., Tsukiyama T., Niwa O. 1995. Genomic organization and isoforms of the mouse ELP gene. *J.Biochem.(Tokyo).* 118 : 380-389.

Nomura M., Bartsch S., Nawata H., Omura T., Morohashi K. 1995. An E box element is required for the expression of the ad4bp gene, a mammalian homologue of ftz-f1 gene, which is essential for adrenal and gonadal development. *J.Biol.Chem.* 270 : 7453-7461.

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.

O'Neill M., Binder M., Smith C., Andrews J., Reed K., Smith M., Millar C., Lambert D., Sinclair A. 2000. ASW : a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev.Genes Evol.* 210 : 243-249.

Ohe K., Lalli E., Sassone-Corsi P. 2002. A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99 : 1146-1151.

Ohtani H., Miura I., Ichikawa Y. 2003. Role of aromatase and androgene receptor expression in gonadal sex

differentiation of ZW/ZZ-type frogs, *Rana rugosa*. *Comp.Bioch.Physiol.Part C.* 134 : 215-225.

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

Oreal E., Mazaud S., Picard J.Y., 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.

Ottolenghi C., Moreira-Filho C., Mendonca B.B., Barbieri M., Fellous M., Berkovitz G.D., McElreavey K. 2001. Absence of mutations involving the LIM homeobox domain gene LHX9 in 46,XY gonadal agenesis and dysgenesis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86 : 2465-2469.

Ottolenghi C., Fellous M., Barbieri M., McElreavey K. 2002. Novel paralogy relations among human chromosomes support a link between the phylogeny of doublesex-related genes and the evolution of sex determination. *Genomics.* 79 : 333-343.

Ozisik G., Achermann J.C., Meeks J.J., Jameson J.L. 2003. SF1 in the development of the adrenal gland and gonads. *Horm.Res.* 59 Suppl 1 : 94-98.

Pailhoux E., Vigier B., Chaffaux S., Servel N., Taourit S., Furet J.P., Fellous M., Grosclaude F., Cribiu E.P., Cotinot C., Vaiman D. 2001a. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat.Genet.* 29 : 453-458.

Pailhoux E., Parma P., Sundstrom J., Vigier B., Servel N., Kuopio T., Locatelli A., Pelliniemi L.J., Cotinot C. 2001b. Time course of female-to-male sex reversal in 38,XX fetal and postnatal pigs. *Dev.Dyn.* 222 : 328-340.

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

Palmer S.J., Burgoyne P.S. 1991. In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX----XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development.* 112 : 265-268.

Pannetier M., Servel N., Cocquet J., Besnard N., Cotinot C., Pailhoux E. 2003. Expression studies of the PIS-regulated genes suggest different mechanisms of sex determination within mammals. *Cytogenet.Genome Res.* 101 : 199-205.

Parma P., Pailhoux E., Cotinot C. 1999. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. *Biol.Reprod.* 61 : 741-748.

Parr B.A., McMahon A.P. 1998. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature.* 395 : 707-710.

Pask A., Renfree M.B., Marshall Graves J.A. 2000. The human sex-reversing ATRX gene has a homologue on the marsupial Y chromosome, ATRY: implications for the evolution of mammalian sex determination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97 : 13198-13202.

Pask A.J., Harry J.L., Renfree M.B., Marshall Graves J.A. 2000. Absence of SOX3 in the developing marsupial gonad is not consistent with a conserved role in mammalian sex determination. *Genesis.* 27 : 145-152.

Pask A.J., Harry J.L., Graves J.A., O'Neill R.J., Layfield S.L., Shaw G., Renfree M.B. 2002. SOX9 has both conserved and novel roles in marsupial sexual differentiation. *Genesis.* 33 : 131-139.

Pask A.J., Behringer R.R., Renfree M.B. 2003. Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis--from marsupials to mice. *Cytogenet.Genome Res.* 101 : 229-236.

Payen E., Pailhoux E., Abou M.R., Gianquinto L., Kirszenbaum M., Locatelli A., Cotinot C. 1996. Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. *Int.J.Dev.Biol.* 40 : 567-575.

Pellegrini M., Pantano S., Lucchini F., Fumi M., Forabosco A. 1997. Emx2 developmental expression in the primordia of the reproductive and excretory systems. *Anat.Embryol.(Berl).* 196 : 427-433.

Penrad-Mobayed M., Moreau N., Angelier N. 1998. Evidence for specific RNA/protein interactions in the differential segment of the W sex chromosome in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *Dev.Growth Differ.* 40 : 147-156.

Pfeifer D., Kist R., Dewar K., Devon K., Lander E.S., Birren B., Korniszewski L., Back E., Scherer G. 1999.

Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9: evidence for an extended control region. *Am.J.Hum.Genet.* 65 : 111-124.

Picketts D.J., Tastan A.O., Higgs D.R., Gibbons R.J. 1998. Comparison of the human and murine ATRX gene identifies highly conserved, functionally important domains. *Mamm.Genome.* 9 : 400-403.

Pieau C. 1971. Sex ratio in the embryos of 2 chelonians (*Testudo graeca* L. and *Emys orbicularis* L.) born of artificially incubated ova. *C.R.Acad.Sci.Hebd.Seances Acad.Sci.D.* 272 : 3071-3074.

Pieau C. 1974. Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien); effets des hormones sexuelles. *Ann.Emb.Morph.* 7 : 365-394.

Pieau C. 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. *Bioessays.* 18 : 19-26.

Pieau C., Dorizzi M., Richard-Mercier N., Desvages G. 1998. Sexual differentiation of gonads as a function of temperature in the turtle *Emys orbicularis*: endocrine function, intersexuality and growth. *J.Exp.Zool.* 281 : 400-408.

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

Pilon N., Behdjani R., Daneau I., Lussier J.G., Silversides D.W. 1998. Porcine steroidogenic factor-1 gene (pSF-1) expression and analysis of embryonic pig gonads during sexual differentiation. *Endocrinology.* 139 : 3803-3812.

Place A.R., Lang J., Gavasso S., Jeyasuria P. 2001. Expression of P450(arom) in *Malaclemys terrapin* and *Chelydra serpentina* : a tale of two sites. *J.Exp.Zool.* 290 : 673-690.

Poulat F., Girard F., Chevron M.P., Goze C., Rebillard X., Calas B., Lamb N., Berta P. 1995. Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J.Cell Biol.* 128 : 737-748.

Poulat F., Barbara P.S., Desclozeaux M., Soullier S., Moniot B., Bonneaud N., Boizet B., Berta P. 1997. The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J.Biol.Chem.* 272 (11) : 7167-7172.

Pratt W.B., Gehring U., Toft D.O. 1996. Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. *EXS.* 77 : 79-95.

Preiss S., Argentaro A., Clayton A., John A., Jans D.A., Ogata T., Nagai T., Barroso I., Schafer A.J., Harley V.R. 2001. Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J.Biol.Chem.* 276 : 27864-27872.

Qin Y., Poirier C., Truong C., Schumacher A., Agoulnik A.I., Bishop C.E. 2003. A major locus on mouse chromosome 18 controls XX sex reversal in Odd Sex (Ods) mice. *Hum.Mol.Genet.* 12 : 509-515.

Ramachandran B., Schlinger B.A., Arnold A.P., Campagnoni A.T. 1999. Zebra finch aromatase gene expression is regulated in the brain through an alternate promoter. *Gene.* 240 : 209-216.

Raymond C.S., Shamu C.E., Shen M.M., Seifert K.J., Hirsch B., Hodgkin J., Zarkower D. 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature.* 391 : 691-695.

Raymond C.S., Parker E.D., Kettlewell J.R., Brown L.G., Page D.C., Kusz K., Jaruzelska J., Reinberg Y., Flejter W.L., Bardwell V.J., Hirsch B., Zarkower D. 1999a. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum.Mol.Genet.* 8 : 989-996.

Raymond C.S., Kettlewell J.R., Hirsch B., Bardwell V.J., Zarkower D. 1999b. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev.Biol.* 215 : 208-220.

Raymond C.S., Murphy M.W., O'Sullivan M.G., Bardwell V.J., Zarkower D. 2000. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 14 : 2587-2595.

Raynaud A., Frilley M. 1947. Destruction des glandes génitales de l'embryon de souris par une irradiation au moyen des rayons X, à l'âge de 13 jours. *Ann.Endocrinol.(Paris).* 8 : 400-419.

Robert K.A., Thompson M.B. 2001. Sex determination. Viviparous lizard selects sex of embryos. *Nature.* 412 : 698-699.

Robertson K.M., O'Donnell L., Jones M.E., Meachem S.J., Boon W.C., Fisher C.R., Graves K.H., McLachlan R.I.,

Simpson E.R. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96 : 7986-7991.

Rossi P., Dolci S., Albanesi C., Grimaldi P., Geremia R. 1993. Direct evidence that the mouse sex-determining gene Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. *Mol.Reprod.Dev.* 34 : 369-373.

Ryan G., Steele-Perkins V., Morris J.F., Rauscher F.J., Dressler G.R. 1995. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development.* 121 : 867-875.

Saidapur S.K., Gramapurohit N.P., Shanbhag B.A. 2001. Effect of sex steroids on gonadal differentiation and sex reversal in the frog, *Rana curtipes*. *Gen.Comp Endocrinol.* 124 : 115-123.

Saillant E., Fostier A., Haffray P., Menu B., Thimonier J., Chatain B. 2002. Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L .*). *J.Exp.Zool.* 292 : 494-505.

Salas-Cortes L., Jaubert F., Bono M.R., Fellous M., Rosemblatt M. 2001. Expression of the human SRY protein during development in normal male gonadal and sex-reversed tissues. *J.Exp.Zool.* 290 : 607-615.

Scheib D. 1983. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation.* 23 Suppl : S87-S92.

Schepers G., Wilson M., Wilhelm D., Koopman P. 2003. SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J.Biol.Chem.* 278 : 28101-28108.

Schlinger B.A., Arnold A.P. 1991a. Brain is the major site of estrogen synthesis in a male songbird. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88 : 4191-4194.

Schlinger B.A., Arnold A.P. 1991b. Androgen effects on the development of the zebra finch song system. *Brain Res.* 561 : 99-105.

Schmahl J., Capel B. 2003. Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev.Biol.* 258 : 264-276.

Schmahl J., Eicher E.M., Washburn L.L., Capel B. 2000. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development.* 127 : 65-73.

Schmahl J., Yao H.H., Pierucci-Alves F., Capel B. 2003. Colocalization of WT1 and cell proliferation reveals conserved mechanisms in temperature-dependent sex determination. *Genesis.* 35 : 193-201.

Scholz S., Gutzeit H.O. 2000. 17-alpha-ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic.Toxicol.* 50 : 363-373.

Schomberg D.W., Couse J.F., Mukherjee A., Lubahn D.B., Sar M., Mayo K.E., Korach K.S. 1999. Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology.* 140 : 2733-2744.

Sebastian S., Bulun S.E. 2001. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86 : 4600-4602.

Semba K., Saito-Ueno R., Takayama G., Kondo M. 1996. cDNA cloning and its pronephros-specific expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, from *Xenopus laevis*. *Gene.* 175 : 167-172.

Shan Z., Nanda I., Wang Y., Schmid M., Vortkamp A., Haaf T. 2000. Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, DMRT1, in birds. *Cytogenet.Cell Genet.* 89 : 252-257.

Shawlot W., Behringer R.R. 1995. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature.* 374 : 425-430.

Shen J.H., Ingraham H.A. 2002. Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol.Endocrinol.* 16 : 529-540.

Shen P., Campagnoni C.W., Kampf K., Schlinger B.A., Arnold A.P., Campagnoni A.T. 1994. Isolation and characterization of a zebra finch aromatase cDNA: in situ hybridization reveals high aromatase expression in brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 24 : 227-237.

Shen W.H., Moore C.C., Ikeda Y., Parker K.L., Ingraham H.A. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates

the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell.* 77 : 651-661.

Shi D.L., Boucaut J.C. 1995. The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int.J.Dev.Biol.* 39 : 427-441.

Shibata K., Takase M., Nakamura M. 2002. The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen.Comp Endocrinol.* 127 : 232-241.

Sim E.U., Smith A., Szilagi E., Rae F., Ioannou P., Lindsay M.H., Little M.H. 2002. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene.* 21 : 2948-2960.

Simeone A., Gulisano M., Acampora D., Stornaiuolo A., Rambaldi M., Boncinelli E. 1992. Two vertebrate homeobox genes related to the Drosophila empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J.* 11 : 2541-2550.

Simpson E.R., Mahendroo M.S., Means G.D., Kilgore M.W., Hinshelwood M.M., Graham-Lorence S., Amarneh B., Ito Y., Fisher C.R., Michael M.D. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr.Rev.* 15 : 342-355.

Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 346 : 240-244.

Smith C.A., Joss J.M. 1994a. Sertoli cell differentiation and gonadogenesis in *Alligator mississippiensis*. *J.Exp.Zool.* 290 : 691-699.

Smith C.A., Joss J.M. 1994b. Steroidogenic enzyme activity and ovarian differentiation in the saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*. *Gen.Comp Endocrinol.* 93 : 232-245.

Smith C.A., Elf P.K., Lang J.W., Joss J.M.P. 1995. Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos. *Differentiation.* 58 : 281-290.

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

Smith C.A., Smith M.J., Sinclair A.H. 1999a. Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *Gen.Comp Endocrinol.* 113 : 187-196.

Smith C.A., McClive P.J., Western P.S., Reed K.J., Sinclair A.H. 1999b. Conservation of a sex-determining gene. *Nature.* 402 : 601-602.

Smith C.A., Smith M.J., Sinclair A.H. 1999c. Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene.* 234 : 395-402.

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

Smith C.A., Katz M., Sinclair A.H. 2003. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol.Reprod.* 68 : 560-570.

Smith L., Van Hateren N., Willan J., Romero R., Blanco G., Siggers P., Walsh J., Banerjee R., Denny P., Ponting C., Greenfield A. 2003. Candidate testis-determining gene, Maestro (Mro), encodes a novel HEAT repeat protein. *Dev.Dyn.* 227 : 600-607.

Soullier S., Hanni C., Catzeflis F., Berta P., Laudet V. 1998. Male sex determination in the spiny rat *Tokudaia osimensis* (Rodentia: Muridae) is not Sry dependent. *Mamm.Genome.* 9 : 590-592.

Spotila L.D., Spotila J.R., Hall S.E. 1998. Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J.Exp.Zool.* 281 : 417-427.

Sreenivasulu K., Ganesh S., Raman R. 2002. Evolutionarily conserved, DMRT1, encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, *Calotes versicolor*. *Gene Expr.Patterns.* 2 : 51-60.

Stevanovic M., Lovell-Badge R., Collignon J., Goodfellow P.N. 1993. SOX3 is an X-linked gene related to SRY.

*Hum.Mol.Genet.* 2 : 2013-2018.

Sudbeck P., Scherer G. 1997. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J.Biol.Chem.* 272 : 27848-27852.

Sudbeck P., Schmitz M.L., Baeuerle P.A., Scherer G. 1996. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat.Genet.* 13 : 230-232.

Sugita J., Takase M., Nakamura M. 2001. Expression of Dax-1 during gonadal development of the frog. *Gene.* 280 : 67-74.

Sumida K., Ooe N., Saito K., Kaneko H. 2001. Molecular cloning and characterization of reptilian estrogen receptor cDNAs. *Mol.Cell Endocrinol.* 183 : 33-39.

Sutou S., Mitsui Y., Tsuchiya K. 2001. Sex determination without the Y chromosome in two Japanese rodents Tokudaia osimensis osimensis and Tokudaia osimensis spp. *Mamm.Genome.* 12 : 17-21.

Suzuki T., Kasahara M., Yoshioka H., Morohashi K., Umesono K. 2003. LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. *Mol.Cell Biol.* 23 : 238-249.

Swain A., Zanaria E., Hacker A., Lovell-Badge R., Camerino G. 1996. Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat.Genet.* 12 : 404-409.

Swain A., Narvaez V., Burgoyne P., Camerino G., Lovell-Badge R. 1998. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature.* 391 : 761-767.

Sweitzer T.D., Hanover J.A. 1996. Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93 : 14574-14579.

Tajima T., Nakae J., Shinohara N., Fujieda K. 1994. A novel mutation localized in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum.Mol.Genet.* 3 : 1187-1189.

Takada S., Koopman P. 2003. Origin and possible roles of the Sox8 transcription factor gene during sexual development. *Cytogenet.Genome Res.* 101 : 212-218.

Takamatsu N., Kanda H., Ito M., Yamashita A., Yamashita S., Shiba T. 1997. Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene.* 202 : 167-170.

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.

Taketo M., Parker K.L., Howard T.A., Tsukiyama T., Wong M., Niwa O., Morton C.C., Miron P.M., Seldin M.F. 1995. Homologs of Drosophila Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics.* 25 : 565-567.

Tanaka M., Telecky T.M., Fukada S., Adachi S., Chen S., Nagahama Y. 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 beta in the ovary. *J.Mol.Endocrinol.* 8 : 53-61.

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*). *J.Biochem.(Tokyo).* 117 : 719-725.

Tchoudakova A., Callard G.V. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology.* 139 : 2179-2189.

Tchoudakova A., Kishida M., Wood E., Callard G.V. 2001. Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 78 : 427-439.

Terashima M., Toda K., Kawamoto T., Kuribayashi I., Ogawa Y., Maeda T., Shizuta Y. 1991. Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P450. *Arch.Biochem.Biophys.* 285 : 231-237.

Tevosian S.G., Albrecht K.H., Crispino J.D., Fujiwara Y., Eicher E.M., Orkin S.H. 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development.* 129 : 4627-4634.

Thibault C., Beaumont A., Levasseur M.C. 1998. «La reproduction des vertébrés». Paris, MASSON. 307p. (Collection Enseignement des Sciences de la Vie).

Tilmann C., Capel B. 1999. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development.* 126 : 2883-2890.

Tohonen V., Osterlund C., Nordqvist K. 1998. Testatin: a cystatin-related gene expressed during early testis development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95 : 14208-14213.

Tommerup N., Schempp W., Meinecke P., Pedersen S., Bolund L., Brandt C., Goodpasture C., Guldberg P., Held K.R., Reinwein H. 1993. Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat.Genet.* 4 : 170-174.

Tong S.K., Chiang E.F., Hsiao P.H., Chung B. 2001. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish cyp19 (P450 aromatase) genes. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 79 : 299-303.

Torres Maldonado L.C., Landa P.A., Moreno-Mendoza N., Marmolejo V.A., Meza M.A., Merchant L.H. 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.

Torres M., Gomez-Pardo E., Dressler G.R., Gruss P. 1995. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development.* 121 : 4057-4065.

Trant J.M., Gavasso S., Ackers J., Chung B.C., Place A.R. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J.Exp.Zool.* 290 : 475-483.

Trapman J., Klaassen P., Kuiper G.G., Van der Korput J.A., Faber P.W., Van Rooij H.C., Geurts van Kessel A., Voorhorst M.M., Mulder E., Brinkmann A.O. 1988. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 153 : 241-248.

Tremblay J.J., Viger R.S. 1999. Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol.Endocrinol.* 13 : 1388-1401.

Tremblay J.J., Viger R.S. 2001. Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol.Reprod.* 64 : 1191-1199.

Tremblay J.J., Viger R.S. 2003. A mutated form of steroidogenic factor 1 (SF-1 G35E) that causes sex reversal in humans fails to synergize with transcription factor GATA-4. *J.Biol.Chem.* 278 : 42637-42642.

Tsai C.L., Chang S.L., Wang L.H., Chao T.Y. 2003. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain. *J.Neuroendocrinol.* 15 : 97-102.

Udar N., Yellore V., Chalukya M., Yelchits S., Silva-Garcia R., Small K. 2003. Comparative analysis of the FOXL2 gene and characterization of mutations in BPES patients. *Hum.Mutat.* 22 : 222-228.

Ueda H., Sonoda S., Brown J.L., Scott M.P., Wu C. 1990. A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes Dev.* 4 : 624-635.

Uzumcu M., Dirks K.A., Skinner M.K. 2002. Inhibition of platelet-derived growth factor actions in the embryonic testis influences normal cord development and morphology. *Biol.Reprod.* 66 : 745-753.

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

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

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

Vaiman D., Pailhoux E. 2000. Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *Trends Genet.* 16 : 488-494.

Vainio S., Heikkila M., Kispert A., Chin N., McMahon A.P. 1999. Female development in mammals is regulated by

Wnt-4 signalling. *Nature.* 397 : 405-409.

Val P., Lefrancois-Martinez A.M., Veyssiere G., Martinez A. 2003. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl.Recept.* 1 : 8-31.

Valle L.D., Ramina A., Vianello S., Belvedere P., Colombo L. 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 82 : 19-32.

Valleley E.M., Cartwright E.J., Croft N.J., Markham A.F., Coletta P.L. 2001. Characterisation and expression of Sox9 in the Leopard gecko, *Eublepharis macularius. J.Exp.Zool.* 291 : 85-91.

Van den Hurk R., Van Oordt P.G. 1985. Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, Salmo gairdneri. *Gen.Comp Endocrinol.* 57 : 216-222.

Van den H.R., Lambert J.G., Peute J. 1982. Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry (Salmo gairdneri) before and after the onset of gonadal sex differentiation. *Reprod.Nutr.Dev.* 22 : 413-425.

Veith A.M., Froschauer A., Korting C., Nanda I., Hanel R., Schmid M., Schartl M., Volff J.N. 2003. Cloning of the dmrt1 gene of Xiphophorus maculatus: dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene.* 317 : 59-66.

Veitia R., Nunes M., Brauner R., Doco-Fenzy M., Joanny-Flinois O., Jaubert F., Lortat-Jacob S., Fellous M., McElreavey K. 1997. Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics.* 41 : 271-274.

Vidal V.P., Chaboissier M.C., de Rooij D.G., Schedl A. 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat.Genet.* 28 : 216-217.

Viger R.S., Mertineit C., Trasler J.M., Nemer M. 1998. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development.* 125 : 2665-2675.

Vigier B., Tran D., du Mesnil du B.F., Heyman Y., Josso N. 1983. Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-Mullerian hormone. *J.Reprod.Fertil.* 69 : 207-214.

Volff J.N., Kondo M., Schartl M. 2003. Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends Genet.* 19 : 196-199.

Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F.D., 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., Badawy G.M., Wallace B.M. 1999. Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell Mol.Life Sci.* 55 : 901-909.

Wallace H., Wallace B.M.N. 2000. Sex reversal of the newt *Triturus cristatus* reared at extreme temperatures. *Int.J.Dev.Biol.* 44 : 807-810.

Walter P., Green S., Greene G., Krust A., Bornert J.M., Jeltsch J.M., Staub A., Jensen E., Scrace G., Waterfield M. 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82 : 7889-7893.

Wang D.S., Kobayashi T., Senthilkumaran B., Sakai F., Sudhakumari C.C., Suzuki T., Yoshikuni M., Matsuda M., Morohashi K., Nagahama Y. 2002. Molecular cloning of DAX1 and SHP cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus. Biochem.Biophys.Res.Commun.* 297 : 632-640.

Wang L.H., Tsai C.L. 2000. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus. J.Exp.Zool.* 286 : 534-537.

Wang Z.Y., Qiu Q.Q., Deuel T.F. 1993. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J.Biol.Chem.* 268 : 9172-9175.

Wegner M. 1999. From head to toes : the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Research.* 27 (6) : 1409-1420.

Weiss J., Meeks J.J., Hurley L., Raverot G., Frassetto A., Jameson J.L. 2003. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol.Cell Biol.* 23 : 8084-8091.

Wells L.J., Cavanaugh M.W., Maxwell E.L. 1954. Genital abnormalities in castrated fetal rats and their prevention by means of testosterone propionate. *Anat.Rec.* 118 : 109-134.

Welshons W.J., Russell L.B. 1959. The Y chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 45 : 560-566.

Wennstrom K.L., Crews D. 1995. Making males from females: the effects of aromatase inhibitors on a parthenogenetic species of whiptail lizard. *Gen.Comp Endocrinol.* 99 : 316-322.

Wennstrom K.L., Gill C.J., 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.

Western P.S., Harry J.L., Graves J.A., Sinclair A.H. 1999a. Temperature-dependent sex determination: upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Dev.Dyn.* 214 : 171-177.

Western P.S., Harry J.L., Graves J.A., Sinclair A.H. 1999b. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev.Dyn.* 216 : 411-419.

Western P.S., Harry J.L., Marshall Graves J.A., Sinclair A.H. 2000. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene.* 241 : 223-232.

Whitfield L.S., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. 1993. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature.* 364 : 713-715.

Whitworth D.J., Pask A.J., Shaw G., Marshall Graves J.A., Behringer R.R., Renfree M.B. 2001. Characterization of steroidogenic factor 1 during sexual differentiation in a marsupial. *Gene.* 277 : 209-219.

Wibbels T., Crews D. 1992. Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. *J.Endocrinol.* 133 : 121-129.

Wibbels T., Crews D. 1994. Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature-dependent sex determination. *J.Endocrinol.* 141 : 295-299.

Wilhelm D., Englert C. 2002. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 16 : 1839-1851.

Willingham E., Baldwin R., Skipper J.K., 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. *Gen.Comp Endocrinol.* 119 : 202-207.

Wolff Et., Wolff Em. 1951. The effects of castration in bird embryo. *J.Exp.Zool.* 116 : 59-97.

Wong M., Ramayya M.S., Chrousos G.P., Driggers P.H., Parker K.L. 1996. Cloning and sequence analysis of the human gene encoding steroidogenic factor 1. *J.Mol.Endocrinol.* 17 : 139-147.

Wright E., Hargrave M.R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., Evans T., Gangadharan U., Greenfield A., Koopman P. 1995. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat.Genet.* 9 : 15-20.

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.

Wunderle V.M., Critcher R., Hastie N., Goodfellow P.N., Schedl A. 1998. Deletion of long-range regulatory elements upstream of SOX9 causes campomelic dysplasia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95 : 10649-10654.

Yamamoto T. 1962. Hormonic factors affecting gonadal sex differentiation in fish. *Gen.Comp Endocrinol.* Suppl 1 : 341-345.

Yao H.H., Whoriskey W., Capel B. 2002. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 16 : 1433-1440.

Yntema C.L. 1976. Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*. *J.Morphol.* 150 : 453-462.

Yokoi H., Kobayashi T., Tanaka M., Nagahama Y., Wakamatsu Y., Takeda H., Araki K., Morohashi K., Ozato K. 2002. Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad

differentiation. *Mol.Reprod.Dev.* 63 : 5-16.

Yoshida K., Shimada K., Saito N. 1996. Expression of P450 (17 alpha) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen.Comp Endocrinol.* 102 : 233-240.

Yoshiura Y., Senthilkumaran B., Watanabe M., Oba Y., Kobayashi T., Nagahama Y. 2003. Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus,* during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. *Biol.Reprod.* 68 : 1545-1553.

Yu N.W., Hsu C.Y., Ku H.H., Chang L.T., Liu H.W. 1993. Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione. *J.Exp.Zool.* 265 : 252-257.

Yu R.N., Ito M., Saunders T.L., Camper S.A., Jameson J.L. 1998. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat.Genet.* 20 : 353-357.

Yussa M., Lohr U., Su K., Pick L. 2001. The nuclear receptor Ftz-F1 and homeodomain protein Ftz interact through evolutionarily conserved protein domains. *Mech.Dev.* 107 : 39-53.

Zaborski P. 1986. 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.

Zanaria E., Muscatelli F., Bardoni B., Strom T.M., Guioli S., Guo W., Lalli E., Moser C., Walker A.P., McCabe E.R. 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature.* 372 : 635-641.

Zazopoulos E., Lalli E., Stocco D.M., Sassone-Corsi P. 1997. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature.* 390 : 311-315.

Zhao L.J., Zhang S., Chinnadurai G. 2002. Sox9 transactivation and testicular expression of a novel human gene, KIAA0800. *J.Cell Biochem.* 86 : 277-289.

Zhou R., Liu L., Guo Y., Yu H., Cheng H., Huang X., Tiersch T.R., 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.

Zimmermann S., Schottler P., Engel W., Adham I.M. 1997. Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development. *Mol.Reprod.Dev.* 47 : 30-38.

Zimmermann S., Schwarzler A., Buth S., Engel W., Adham I.M. 1998. Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1. *Mol.Endocrinol.* 12 : 706-713.

Zimmermann S., Steding G., Emmen J.M., Brinkmann A.O., Nayernia K., Holstein A.F., Engel W., Adham I.M. 1999. Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol.Endocrinol.* 13 : 681-691.

Zlotogora J., Sagi M., Cohen T. 1983. The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *Am.J.Hum.Genet.* 35 : 1020-1027.

Zorn A.M., Barish G.D., Williams B.O., Lavender P., Klymkowsky M.W., Varmus H.E. 1999. Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol.Cell.* 4 : 487-498.

# ANNEXES

*** Annexe 1**

JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY 296A:46–55 (2003)

# Effects of Androgens on Sex Differentiation of the Urodele *Pleurodeles waltl*

D. CHARDARD*, S. KUNTZ, A. CHESNEL, AND S. FLAMENT
*EA 3443 Génétique Signalisation Différenciation, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

*ABSTRACT* In nonmammalian vertebrates, steroids have been hypothesized to induce somatic sex differentiation, since manipulations of the steroidal environment of gonads have led to various degrees of sex reversal. Whereas the critical role of estrogens in ovarian differentiation is well documented, studies on androgens have produced a perplexing variety of results depending upon species variations and nature of androgens used. In this way, testosterone induces masculinization of females in some species but provokes paradoxical feminization of males in many other species such as the urodelan *Pleurodeles waltl*. In reptiles this phenomenon could be interpreted by conversion of exogenous testosterone to estradiol by aromatase. Treatments of Pleurodeles larvae with nonaromatizable androgens bring support to this hypothesis and suggest a role of androgens in sex differentiation. Dihydrotestosterone (DHT) could not induce the paradoxical feminization of ZZ larvae. In addition, DHT as well as 11β-hydroxy-androstenedione could drive a functional male differentiation of ZW larvae. Moreover, other 5α reduced androgens also induced sex reversal of female larvae. Yet, the 5α reductase inhibitor CGP 53133 and antiandrogens such as flutamide or cyproterone acetate did not exert any effect on male sex differentiation of ZZ larvae. Though the precise role of androgens is still unknown, especially for 11-oxygenated androgens, our results suggest an implication in male sex differentiation. In this way, testosterone could play a pivotal role in being metabolized either into other androgens during testis differentiation or into estradiol during ovarian differentiation. *J. Exp. Zool. 296A:46–55, 2003.* © 2003 Wiley-Liss, Inc.

## INTRODUCTION

Numerous studies have focused on implication of steroid hormones in sex differentiation of vertebrates. In mammals, pioneering works of Jost ('53) have demonstrated that steroids control genital ducts differentiation and secondary sex characteristics development whereas in lower vertebrates, steroids act at a primary step of sex differentiation. Indeed, treatments of embryos or larvae with hormones, anti-hormones or steroidogenesis enzyme inhibitors have led to sex reversal in fishes (review Hunter and Donaldson, '83; Borg, '94), amphibians (review Hayes, '98), reptiles (Pieau et al., '94, 2001) and birds (Scheib, '83).

The central role of estrogens in female sex differentiation has been pointed out and described in species with temperature-dependent sex determination (TSD) as well as in species with genotypic sex determination (GSD). In the first case, estradiol counteracts temperature effect as in reptiles with TSD where incubation of eggs at a masculinizing temperature in the presence of estradiol leads to hatching of females. Moreover, estradiol sensitive period correlates with thermosensitive period (Crews et al., '89, '91). In all species studied, a high activity of the estrogen synthesizing enzyme aromatase is correlated with ovary differentiation. Besides, in all vertebrate classes, mammals excepted, aromatase inhibitor treatments have led to various degrees of masculinization including, in some species, complete and functional sex reversal (Elbrecht and Smith, '92; Yu et al., '93; Dorizzi et al., '94; Piferrer et al., '94; Chardard and Dournon, '99).

Potential role of androgens in male differentiation is more controversial. Sex reversal of female embryos by androgens is observed in many species. In fish, functional sex reversal of genotypic female XX embryos occurs with methyltestosterone in the medaka *Oryzias latipes* (Yamamoto, '58) and in rainbow trout (Cousin et al., '89). A natural androgen, 11β-hydroxyandrostenedione (11βOHA) also shows high mascu-

*Correspondence to: D. Chardard, Laboratoire de Biologie Expérimentale—Immunologie, EA 3442, Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté des Sciences, BP239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail: chardard@scbiol.uhp-nancy.fr
Received 22 July 2002; Accepted 8 November 2002
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jez.a.10240

© 2003 WILEY-LISS, INC.

linizing potential in rainbow trout (van den Hurk and van Oordt, '85) and in *Oreochromis niloticus* (Baroiller and Toguyeni, '96). Indeed, 11-oxygenated androgens could act in many aspects of male physiology in fish (Borg, '94). In reptiles, up to now, a masculinizing effect of testosterone has been described in only one species : the lizard *Calotes versicolor* (Ganesh and Raman, '95). Interestingly, in this species, estradiol and temperature have no effect on sex differentiation. In reptiles with TSD, testosterone applied to embryos incubated at masculinizing temperature induces feminization (Pieau, '74; Gutzke and Bull, '86; Crews et al., '89; Wibbels and Crews, '92). This paradoxical effect has been interpreted as a conversion of exogenous testosterone in estradiol by aromatase. Studies have then focused on nonaromatizable androgens. Indeed, in addition to its metabolization into estradiol by aromatase, testosterone may be modified in dihydrotestosterone (DHT) by 5α reductase. In the turtle *Trachemys scripta*, DHT increases the percentage of males obtained at the transition temperature at which both sexes are ordinary produced in equal proportions (Crews and Bergeron, '94). Conversely, reductase inhibitor applied at the same temperature increases female percentage, and finally, simultaneous supply of DHT and estradiol gives intersexes that are not currently observed in this species (Crews and Bergeron, '94). However, these effects are not observed at feminizing temperature where 100% females are produced, suggesting for 5α reductase a less important role than that of aromatase.

In amphibians, androgen treatments have led to different results (Adkins-Regan, '87; Hayes, '98). Testosterone can masculinize female tadpoles in Ranidae and Hylidae (Gallien, '62; Saidapur et al., 2001) whereas in urodelan *Triturus*, *Ambystoma* and *Pleurodeles* it causes paradoxical feminization of males (Gallien, '62; Hayes, '98). Even if the hypothesis of aromatization could explain the paradoxical effect observed in amphibians, this was not confirmed by the use of nonaromatizable androgens in these vertebrates. Indeed, addition of DHT to *Bufo bufo* tadpoles maintained gonads in an undifferentiated state (Petrini and Zaccanti, '98).

In the urodele *Pleurodeles waltl*, the paradoxical effect of testosterone was demonstrated by Gallien ('54). In this species, GSD is performed by the ZZ/ZW system of sex chromosomes. However, rearing at a temperature of 32°C induces ZW larvae to differentiate as functional males as long as the treatment occurs during the so-called thermosensitive period (Dournon and Houillon, '85) ranging from larval stage 42 to 54 according to Gallien and Durocher's developmental table ('57). Estradiol or testosterone feminize ZZ larvae (Gallien, '54) and aromatase inhibitor masculinizes ZW larvae when treatments are applied from the beginning of sex differentiation at stage 52 up to metamorphosis at stage 56 (Chardard and Dournon, '99).

The aim of this work was to better understand the role played by androgens in male differentiation and the paradoxical effect of testosterone in amphibians. In order to avoid interactions with aromatase expression, treatments with nonaromatizable androgens were applied to larvae. Our results demonstrate that nonaromatizable androgens induce sex reversal of ZW larvae. In the same experimental conditions, no paradoxical effect on ZZ larvae sex differentiation could be observed suggesting that the effect of testosterone previously described could have been the result of an enhanced aromatase expression.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Animals were reared in our laboratory. Unisexed male larvae were obtained from crosses between a ZZ male and a ZZ neofemale produced by estradiol treatment (offspring references G96, I96 and V97). Unisexed female larvae were obtained from crosses between a standard ZZ male and a WW female previously obtained from a cross between a thermoneomale ZW and a standard ZW female (offspring references G98 and A01). Other crosses were performed between a ZW neomale and a ZW standard female (offspring references U95 and H98).

### *Determination of sexual genotype*

In *Pleurodeles waltl*, sexual genotype can be determined from electrophoretic pattern of peptidase 1, a sex-linked dimeric enzyme (Ferrier et al., '80). The extremity of the tail of the animals was removed and homogenized in 50mM TrisHCl, 2,5mM $MgCl_2$, 25mM NaCl buffer. Samples were run on a 9% stacking, 12% running starch gel. Z and W-linked forms of peptidase were revealed by hydrolysis of valyl-leucine substrate coupled with peroxidase colored reaction. A three banded pattern indicates heterogametic ZW individuals, and a one banded pattern homogametic ones (ZZ or WW).

In the present study, genotyping was performed on each parent, on progenies of ZW × ZW crosses and on progenies of androgen reversed animals.

### *Treatments*

*Pleurodeles* larvae were treated as previously described (Chardard and Dournon, '99). Animals were reared at room temperature in tap water (15 larvae in 4l per tank) containing 100, 400 or 500 µg/l of steroid as a dilution of a stock solution (5mg/ml) in absolute ethanol (see Table 1). Control larvae received only 400µl ethanol. Water and steroid were renewed three times a week following the feeding of larvae.

All steroids, dihydrotestosterone benzoate (DHT), androsterone (AST), 5α-androstane-3α, 17β-diol (3α-diol), 5α-androstane-3β, 17β-diol (3β-diol), 11β-hydroxyandrostenedione (11βOHA), estradiol benzoate (E2) and anti-androgens, flutamide and cyproterone acetate (CPA) were purchased from Sigma corporation. Reductase inhibitor CGP 53133 was supplied by Novartis.

All treatments were realized either during hormonosensitive period from stage 52 (three fingers formed at hind limbs) to the end of metamorphosis at stage 56 (Gallien, '51; Chardard and Dournon, '99) or during thermosensitive period from stage 42 (three fingers at fore limbs) to stage 54 (all fingers at hind limbs) (Dournon and Houillon, '85). Thermosensitive period begins roughly two weeks after hatching and lasts two months, while hormonosensitive period lasts about four months.

Diagnostic of gonadic sex was realized at metamorphosis by examination of gonads after dissection of anaesthetized animals. Following treatment with either DHT or 11βOHA, some animals were raised up to adulthood and mated to test their fertility.

### *Histology*

After metamorphosis, animals were sacrificed for gonadic sex determination. Following the diagnostic, gonads were processed for histological analysis. Tissues were fixed in Bouin's solution, imbedded in paraffin and sectioned at 7µm thickness. Slides were finally colored with hematoxylin-eosin.

## RESULTS

### *DHT induces no paradoxical effect*

By treating larvae of standard offsprings with a water-alcohol solution of testosterone propionate in a concentration of 500 µg/l, renewed every three days, 95% adult females are obtained versus 47% in control batch (Gallien, '50, '54). We applied DHT at the same concentration to ZZ larvae during the hormonosensitive period. No effect was observed on sexual differentiation (Table 1). Newly metamorphosed animals presented testes similar to those of controls (not shown) and developed at maturity into fertile males.

*TABLE 1: Effects of androgens on sex differentiation of Pleurodeles waltl*

| Steroid | Dose | Offspring reference | Number of treated larvae | Genotype of parents | Genotype of progeny | Surviving | Males | Intersexes | Females | % sex reversal |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | Ethanol alone | G98 | 25 | ZZxWW | ZW | 22 | 0 | 0 | 22 | 0 |
| DHT | 500µg/l | U95-H98 | 100 | ZWxWW | ZZ | 16 | 16[a] | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | ZW | 46 | 34[b] | 3 | 9 | 80 |
| | | | | | WW | 14 | 7 | 1 | 6 | 57 |
| AST | 400µg/l | G98 | 30 | ZZxWW | ZW | 25 | 16 | 1 | 8 | 68 |
| 3α-diol | 400µg/l | G98 | 30 | ZZxWW | ZW | 26 | 6 | 4 | 16 | 38 |
| 3β-diol | 400µg/l | G98 | 30 | ZZxWW | ZW | 20 | 3 | 1 | 16 | 20 |
| 11βOHA | 100µg/l | G98 | 30 | ZZxWW | ZW | 25 | 0 | 2 | 23 | 8 |
| 11βOHA | 400µg/l | G98 | 30 | ZZxWW | ZW | 28 | 28[c] | 0 | 0 | 100 |

Treatments were realized from stage 52 to stage 56

% sex reversal is the ratio of number of males and intersexes on total number of surviving animals.

[a]6 of these ZZ animals were raised to adulthood and mated to confirm fertility.

[b]9 of these ZW animals were raised to adulthood and mated to confirm fertility.

[c]6 of these ZW animals were raised to adulthood and mated to confirm fertility.

### *DHT induces masculinization of genetic females*

DHT was then tested on genetically female larvae. The nonaromatizable androgen was applied not only on ZW larvae but also on WW larvae obtained from a cross between a thermoneomale ZW and a standard ZW female. DHT induced a significant percentage of sex reversal although it proved toxic when compared to ethanol alone: 80% of ZW and 57% of WW larvae developed in males or intersexes when treated at 500μg/l (Table 1). Histological examination was performed after metamorphosis. At this stage of development (stage 56), testes of control animals appear with a thin cortical epithelium later differentiating in albuginea, and at the middle of the gonad, mesenchymal tissue with somatic medullary cells

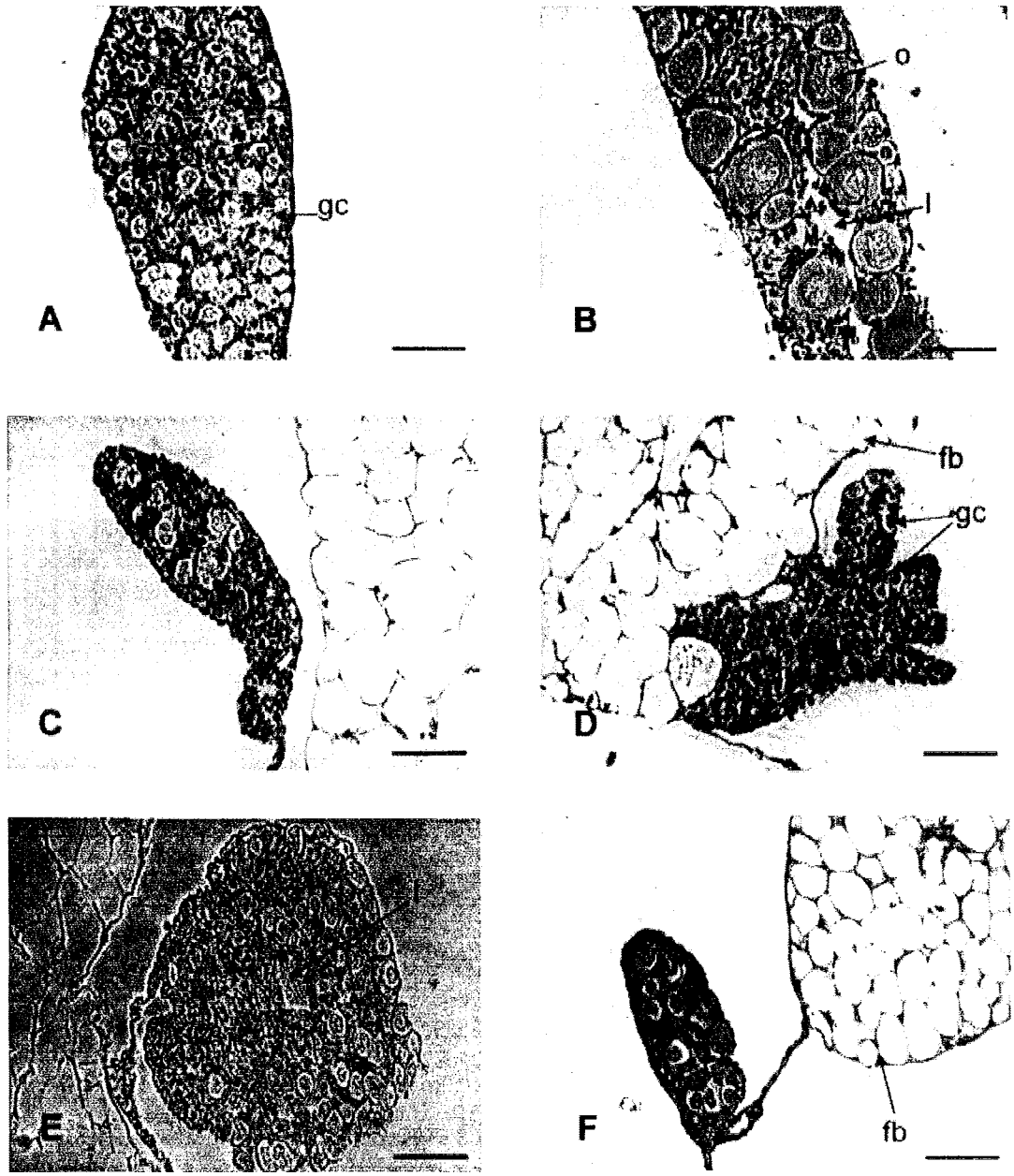



Fig. 1 : Structure of gonads of *P. waltl* at metamorphosis. A: control testis. B: control ovary. C: testis of a ZW individual treated with DHT. D: undifferentiated gonad of a WW individual treated with DHT. E: ovotestis of a ZW individual treated with 11βOHA. F: testis of a ZW individual treated with 11βOHA. gc = germ cell, o = oocyte, l = lacuna, fb = fat body. Bar is 100μm.

enveloping germ cells (Fig. 1A). By contrast, ovaries show a lacunar medulla and a well developed cortex containing germ cells entering oogenesis (Fig. 1B). In DHT treated ZW larvae, histological analysis revealed normal testes although smaller than those of control males and containing few germ cells (Fig. 1C). In a number of cases, especially in WW treated animals, gonads were very reduced, completely disorganized, fused with fat body and contained very few germ cells (Fig. 1D). ZW larvae reversed by DHT reproduced as males when raised up to adulthood. Among 35 crosses performed with 9 of these neomales, 17% produced progeny containing ZZ, ZW and WW animals. This percentage is consistent with those obtained from crosses routinely performed between standard animals. Owing to reduced number of treated animals, the fertility of WW sex reversed animals could not be tested.

Treatments with DHT metabolites, androsterone (AST), 5α-androstane-3α, 17β-diol (3αdiol) and 5α-androstane-3β, 17β-diol (3βdiol) were also tested on female sex differentiation. Although less toxic than DHT, these androgens proved also less efficient in masculinization : sex reversal percentages were respectively 68% for AST, 38% for 3αdiol and 20% for 3βdiol compared to 80% for DHT (Table 1). Histological examination revealed gonads similar to those of DHT treated larvae (not shown).

### *Inhibitors of androgenic pathway have no effect on male sex differentiation*

To test the specificity of androgen-induced sex reversal, ZZ larvae were treated with inhibitors of androgenic pathway (Table 2). The 5α reductase inhibitor, CGP 53133 (Hausler et al., '96) had no effect on male sex differentiation at either dose of 0.4 and 1mg/l. Besides, the anti-androgens cyproterone acetate and flutamide did not induce feminization when applied to ZZ larvae at the concentration of 500μg/l.

### *11βOHA has a high masculinizing effect on female larvae*

Since the inhibitors of the androgenic pathway did not affect male differentiation of the gonad, 11βOHA, another nonaromatizable androgen, was used to confirm the effects of DHT. The results revealed that 11βOHA possessed a higher efficiency than DHT : it induced 100% of sex reversal when used at 400μg/l on ZW larvae (Table 1). This effect was dose-dependent since at 100 μg/l, 11βOHA induced a slight masculinization (8 %) with only two intersexed animals over 25 individuals (Fig. 1E). In contrast, at the same dose (100 μg/l), we observed that estradiol benzoate induced complete sex reversal of ZZ males as previously reported (Gallien, '51). ZW sex reversed animals by 11βOHA showed normal testes (Fig. 1F) but smaller than control testes of untreated ZZ animals (Fig. 1A). When raised up to maturity, 11βOHA reversed animals developed in functional ZW males. Among 16 crosses performed with 6 of these neomales, 12% produced progeny. This percentage is consistent with those obtained from crosses between standard animals. When mated with standard ZW females, these neomales sired offspring with 25% ZZ males, 50% ZW females and 25% WW females as expected and as usually observed with neomales produced by thermal treatment (Dournon and Houillon, '84).

### *11βOHA and estradiol induce sex reversal when applied during thermosensitive period*

Experiments were also designed to specify differences between thermosensitive and hormonosensitive periods in *Pleurodeles waltl* (Table 3). The former was described as the shortest period during which temperature can sex reverse all ZW

*TABLE 2. Effects of androgenic pathway inhibitors on sex differentiation of Pleurodeles waltl*

| Inhibitor | Dose | Offspring reference | Number of treated larvae | Genotype of parents | Genotype of progeny | Surviving | Males | Intersexes | Females |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | Ethanol alone | V97 | 25 | ZZxZZ | ZZ | 21 | 21 | 0 | 0 |
| CGP | 400μg/l | I96 | 15 | ZZxZZ | ZZ | 10 | 10 | 0 | 0 |
| CGP | 1mg/l | V97 | 30 | ZZxZZ | ZZ | 29 | 29 | 0 | 0 |
| Flutamide | 500μg/l | V97 | 30 | ZZxZZ | ZZ | 28 | 28 | 0 | 0 |
| CPA | 500μg/l | V97 | 15 | ZZxZZ | ZZ | 14 | 14 | 0 | 0 |

Treatments were realized from stage 52 to stage 56.

*TABLE 3. Comparison of treatments with estradiol and 11β-hydroxy-androstenedione applied during thermosensitive (stage 42 to 54) or hormonosensitive period (stage 52 to 56).*

| Steroid | Dose | Period of treatment | Offspring reference | Number of treated larvae | Genotype of parents | Genotype of progeny | Surviving | Males | Intersexes | Females | % sex reversal |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 11βOHA | 400μg/l | 52–56 | G98 | 30 | ZZxWW | ZW | 28 | 28 | 0 | 0 | 100 |
| 11βOHA | 400μg/l | 42–54 | A01 | 30 | ZZxWW | ZW | 22 | 13 | 1 | 8 | 64 |
| E2 | 100μg/l | 52–56 | G96 | 64 | ZZxZZ | ZZ | 50 | 2 | 0 | 48 | 96 |
| E2 | 100μg/l | 42–54 | B01 | 30 | ZZxZZ | ZZ | 26 | 1 | 0 | 25 | 96 |

sex reversal is the ratio of number of sex reversed individuals on total number of surviving animals.

larvae exposed to 32 °C (stage 42 to 54) (Dournon and Houillon, '85) while the latter was described as the efficient period for sex reversal of ZZ larvae by estradiol (stage 52 to 56) (Gallien, '51, '54). Stage 53 is the first stage at which sex differentiation of the gonads can be observed by microscopic histological examination. In order to compare both periods, potent steroid treatments were tested during thermosensitive period. 11βOHA induced 13 of 22 surviving ZW larvae to develop in males (64% of sex reversal). So, this treatment was less efficient than those applied during the hormonosensitive period (100% of sex reversal). In contrast, E2 gave similar results for both periods in reversing nearly all exposed ZZ larvae (96% of sex reversal).

## DISCUSSION

The critical role of aromatase and estrogens in ovarian differentiation has been early hypothesized and is now well established in fish (Baroiller and D'Cotta, 2001), amphibians (Hayes, '98), reptiles (Pieau et al., 2001) and birds (Vaillant et al., 2001).

On the other hand, the role of androgens in testis differentiation is a much more debated question, especially in amphibians. Extensive works have shown steroid-induced sex reversal but produced perplexing variety of results (reviewed by Hayes, '98; Wallace et al., '99). Various effects were observed following steroid treatments depending on species, doses and periods of application of the steroid. Moreover, identification of sex-reversed individuals is often difficult as most species lack detectable sex chromosomes. Testosterone can induce masculinization in some anurans such as ranidae but has no effect in others such as the pipidae *Xenopus laevis* and some bufonidae. However, testosterone induces paradoxical feminization of males in urodelan such as *Ambystoma*, *Hynobius* and *Pleurodeles* (reviewed by Hayes, '98; Wallace et al., '99). This feminizing effect of testosterone has been also described in TSD reptiles. Indeed, application of testosterone to eggs incubated at male determining temperature leads to hatching of females (Pieau, '74; Crews et al., '91). In reptiles, this effect of testosterone was interpreted as a conversion of exogenous testosterone in estradiol by aromatase. The absence of paradoxical effect of nonaromatizable androgens confirmed this hypothesis (Crews et al., '96).

The use of nonaromatizable androgens may also help to test this hypothesis in amphibians. Nevertheless, these steroids were used only in a few studies without any significant effect on sex reversal. For instance, in *Bufo bufo,* administration of DHT, a major nonaromatizable androgen in vertebrates, to male and female tadpoles, maintained gonads in an undifferentiated state (Petrini and Zaccanti, '98). However, the results presented here show that DHT has no effect on male differentiation of *Pleurodeles waltl* ZZ larvae. Used at the same concentration, testosterone was reported to provoke female differentiation of ZZ larvae (Gallien, '54). Together, these results strongly suggest that the paradoxical effect of testosterone on ZZ *Pleurodeles* larvae is the result of its aromatization by P450 aromatase. This is in agreement with other results previously obtained in several reptile species.

Moreover, the lack of paradoxical effect observed with DHT is probably not an artifact because when used at the same dose on either ZW or WW animals, DHT induced masculinization. Gonads of DHT reversed animals were smaller than those of control males. This was also observed in other cases of sex reversal such as 11βOHA treatment, aromatase inhibitor treatment (Chardard and Dournon, '99) or heat treatment (our unpublished results). The reason for such a difference in the size of the organ is unknown. This might be due to treatment effects

on the hypothalamic pituitary gonadal axis. However, ZW neomales were fertile and their progeny demonstrated without any doubt sex reversal.

In the same way in *Pleurodeles waltl*, metabolites of DHT such as 3α-diol, 3β-diol and AST, although less efficient, could also induce masculinization of ZW larvae. Similar results have been obtained in the TSD turtle *Trachemys scripta* where DHT and its metabolites raise male percentage at temperatures usually producing female-biased sex ratios (Crews et al., '96). Conversely, DHT had no effect in *Alligator mississipiensis* (Lance and Bogart, '94).

In *Pleurodeles waltl*, we show that the 5α reductase inhibitor CGP 53153 (Hausler et al., '96) has no effect on male differentiation. However, in reptiles, application of 5α reductase inhibitors resulted in producing significant number of females at a male biased temperature in *Trachemys scripta* (Crews and Bergeron, '94). It should be noticed that effects described for DHT and 5α reductase inhibitors in this species were not obtained at temperatures yielding 100% males. In tadpoles of the amphibia *Rana dalmatina* and *Bufo bufo*, the 5α reductase inhibitor, androsten-3one 17β carboxylic acid accelerated ovarian differentiation although no sex reversal occured (Zaccanti et al., '94; Petrini and Zaccanti, '98). In addition to those of the present study, these results disagree with a role of 5α reduced androgens in testis differentiation. Nevertheless, one might argue that these results are related to the lack of specificity of CGP 53133 against the amphibian enzyme. This hypothesis could be tested by using either higher doses of CGP53133 or other 5α reductase inhibitors. In addition, it should be noticed that androgens physiologically required during sex differentiation are unknown in *Pleurodeles waltl*. In adult males, testosterone is the major circulating androgen : it represents 40 to 70% of androgens while levels of DHT are low (<2–3 ng/ml), levels of Δ4 androstenedione very low (< 1 ng/ml) and 17β estradiol is rarely detectable (Garnier, '85). In adult testis, most abundant steroids are, in decreasing order of concentration, Δ4 androstenedione, estrone, progesterone, testosterone while other steroids such as 5α reduced androgens (DHT and 5α-diols) and estradiol are present in very low quantities (Boujard et al., '83).

In order to specify masculinizing effects of androgens, ZW larvae were also treated with inhibitors of androgenic pathway. The anti-androgens flutamide and cyproterone acetate did not exert any effect on *Pleurodeles waltl* male differentiation. Here again, the specificity of these molecules against amphibian proteins is not known. However, flutamide has been demonstrated to exert anti-androgenic effect in *Xenopus laevis* adult ovaries (Lutz et al., 2001). In *Bufo bufo* tadpoles, CPA promotes the process of gonadal sex differentiation in both sexes by accelerating the multiplication of gonia (Petrini and Zaccanti, '98). Paradoxical action of anti-androgens has also been reported in *Rana catesbeiana* where CPA at the dose 1,5 mg/l induced partial or complete transformation of ovaries in testes (Hsu et al., '79); the authors suggest this effect arises from an inhibitory effect of CPA on Δ5–3β -hydroxysteroid dehydrogenase.

We observed that in *Pleurodeles waltl*, the most potent nonaromatizable androgen was 11βOHA. A similar result has been described in fish, for example in Chinook salmon where 11-ketotestosterone is more efficient than testosterone in masculinizing potency suggesting involvement of 11-ketotestosterone rather than testosterone in sex differentiation (Piferrer et al., '93). In fish, these 11-oxygenated androgens are believed to be natural androgens in teleosts (Borg, '94) although no receptor for these androgens has been characterized so far. Administration of 11β-hydroxyandrostenedione in rainbow trout (van den Hurk and van Oordt, '85) and in *Oreochromis niloticus* (Baroiller and Toguyeni, '96), as well as administration of 11-ketotestosterone in medaka (Hishida and Kawamoto, '70) and in coho salmon (Piferrer and Donaldson, '91) induced a clear masculinizing effect. Up to here, 11-oxygenated androgens have not been described in *Pleurodeles*. *In vitro* metabolism studies failed to detect 11-oxygenated androgens in adult testis of *Pleurodeles waltl* (Chardard and Fostier, unpublished results). However, in vitro conversion of testosterone in 11β-hydroxytestosterone and 11-ketotestosterone has been reported in ovary and testis of the newt *Triturus cristatus* (Lupo di Prisco et al., '71, '72). In the same way, 11-ketotestosterone and 11β-hydroxytestosterone have been identified in significant amounts in the plasma of the urodelan *Necturus maculosus* (Bolaffi et al., '79). Further investigations are necessary to clarify the physiological role, if any, of these particular androgens in urodelan.

In species where sex differentiation is thermosensitive, temperature affects steroid production via regulation of steroidogenesis enzymes expression. This effect has been described on aromatase

in fish (D'Cotta et al., 2001), reptiles (Pieau, '96) and amphibians (Chardard et al., '95). In these species, sex determining action of temperature is restricted to a thermosensitive period. We show that in *Pleurodeles waltl*, applications of E2 and 11βOHA during thermosensitive period (stage 42 to stage 54) induced the same effects as when applied during previously described hormonosensitive period (stage 52 to metamorphosis at stage 56), even if 11βOHA was less efficient in masculinizing potencies. During the thermosensitive period, gonads are undifferentiated and the first signs of histologic sex differentiation can be observed at stage 53. The previously described hormonosensitive period (Gallien, '51, '54; Chardard and Dournon, '99) could correspond to retained potentialities of differentiating gonads. This has been described in the turtle *Emys orbicularis* where embryos treated with aromatase inhibitor after thermosensitive period, during which sex is determined, present masculinized ovaries (Dorizzi et al., '96). The results obtained here during thermosensitive period suggest a role of steroids in early gonadal differentiation. In *Pleurodeles waltl*, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity has been detected by histochemistry as soon as stage 44 (Collenot, '64). Aromatase activity has been detected in males and females at stage 47 (Chardard et al., '95) and expression studies detected aromatase mRNA at stage 44 (Kuntz et al., 2003), which suggest very precocious steroidogenic potentialities.

To conclude, our study presents first report in amphibians of complete sex reversal of genetic females by nonaromatizable androgens, including 11βOHA, accounting for a possible role of androgens in male differentiation. Whether these steroids play this role by promoting testis differentiation via androgen receptor binding or by inhibiting ovary differentiation via estrogen receptor blockage or aromatase inhibition remains to be established.

## ACKNOWLEDGMENTS

We should like to acknowledge the technical assistance of Martine Callier and Christiane Tankosic. We also thank Novartis for the gift of reductase inhibitor CGP53133. This work was supported by grants from the "Ligue contre le cancer, Comité de Meurthe et Moselle" and from the "Association pour la Recherche sur le Cancer." Sandra Kuntz was recipient of a grant from the French "Ministère de la Recherche."

## LITERATURE CITED

Adkins-Regan E. 1987. Hormones and sexual differentiation. In : Hormones and reproduction in fish, amphibians and reptiles. D. Norris and R. Jones, eds Plenum Press, New York, pp 1–29.

Baroiller JF, D'Cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. Comp Biochem Physiol 130(C): 399–409.

Baroiller JF, Toguyeni A. 1996. Comparative effects of a natural steroid, 11β-hydroxyandrostenedione (11β-OH-D4) and a synthetic androgen, 17α-methyltestosterone (17α-MT) on sex ratio in *Oreochromis niloticus*. In : Pullin R.S.V., Lazard J, Legendre M, Amon Kothias JB, Pauly D, editors. Proceedings of the third international symposium on tilapia aquaculture. Abidjan, Cte d'Ivoire. p 344–351.

Bolaffi JL, Lance V, Callard IP, Walsh JM, Idler DR. 1979. Identification of 11-ketotestosterone, 11β-hydroxytestosterone and testosterone in plasma of *Necturus maculosus* (Rafinesque). Gen Comp Endocrinol 38:127–131.

Borg B. 1994. Androgens in teleost fish. Comp Biochem Physiol 109C:219–245.

Boujard D, Bassez T, Garnier DH, Joly J. 1983. Incidences de l'hypophysectomie sur les taux d'androgenes plasmatiques et sur les taux de stéroïdes des différents lobes testiculaires chez le triton Pleurodeles. C. R. Acad. Sci. Paris Sér. D 297:319–322.

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

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.

Collenot A. 1964. Mise en évidence histochimique d'une δ5–3β-hydroxystéroïde déshydrogénase dans les gonades non différenciées et en cours de différenciation des mâles génétiques de l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. C R Acad Sc Paris Sér D 259:2535–2537.

Cousin M, Gerber M, Burger G, Boisseau C, Chevassus B. 1989. Effect of methyltestosterone on sex differentiation and gonad morphogenesis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquat Living Resour 2:225–230.

Crews D. 1996. Temperature dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. Zool Science 13:1–13.

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, Wibbels T, Gutzke WHN. 1989. Action of sex steroid hormones on temperature induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). Gen Comp Endocrinol 76:159–166.

Crews D, Bull JJ, Wibbels T. 1991. Estrogen and sex reversal in turtles: a dose dependent phenomenon. Gen Comp Endocrinol 81:357–364.

Crews D, Cantu AR, Bergeron JM. 1996. Temperature and nonaromatizable androgens: a common pathway in male sex determination in a turtle with temperature-dependent sex determination? J Endocrinol 149:457–463.

D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun MS, Baroiller JF. 2001. Aromatase plays a key role during normal and

temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. Mol Reprod Dev 59:265–276.

Dorizzi M, Richard-Mercier N, Pieau C. 1996. The ovary retains male potential after the thermosensitive period for sex determination in the turtle *Emys orbicularis*. Differentiation 60:193–201.

Dorizzi M, Richard-Mercier N, Desvages G, Girondot M, Pieau C. 1994. Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature dependent sex determination. Differentiation 58:1–9.

Dournon C, Houillon C. 1984. Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien Urodèle Pleurodeles waltlii Michah. Reprod Nutr Dév 24:361–378.

Dournon C, Houillon C. 1985. Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodéle *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. Reprod Nutr Dév 25:671–688.

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

Ferrier V, Jaylet A, Cayrol C, Gasser F, Buisan JJ. 1980. Etude électrophorétique des peptidases érythrocytaires chez Pleurodeles waltlii (Amphibien, Urodèle): mise en évidence d'une liaison avec le sexe. C R Acad Sc Paris Sér D 290: 571–574.

Gallien L. 1950. Inversion du sexe et effet paradoxal (féminisation) chez l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah., traité par le propionate de testostérone. C R Acad Sc Paris Sér D 231:1092–1094.

Gallien L. 1951. Sur la descendance unisexuée d'une femelle de *Pleurodeles waltlii* Michah. ayant subi pendant sa phase larvaire l'action gynogène du benzoate d'oestradiol. C R Acad Sc Paris Sér D 290:571–574.

Gallien L. 1954. Inversion expérimentale du sexe sous l'action des hormones sexuelles chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. Analyse des conséquences génétiques. Bull Biol Fr Belg 88:1–51.

Gallien L. 1962. Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. Gen Comp Endocrinol Supp1:346–355.

Gallien L, Durocher M. 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl*. Bull Biol Fr Belg 91:97–114.

Ganesh S, Raman R. 1995. Sex reversal by testosterone and not by estradiol or temperature in *Calotes versicolor*, the lizard lacking sex chromosomes. J Exp Zool 271:139–144.

Garnier DH. 1985. Androgen and estrogen levels in the plasma of *Pleurodeles waltl*, Michah., during the annual cycle. I. Male cycle. Gen. Comp. Endocrinol. 58:376–385.

Gutzke WHN, Bull JJ. 1986. Steroid hormones reverse sex in turtles. Gen Comp Endocrinol 64:368–372.

Hausler A, Allegrini PR, Biollaz M, Batzl C, Scheidegger E, Bhatnagar AS. 1996. CGP53153: a new potent inhibitor of 5α reductase. J Steroid Biochem Molec Biol 57:187–195.

Hayes TB. 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. J Exp Zool 281:373–399.

Hishida T, Kawamoto M. 1970. Androgenic and male-induced effects of 11-ketotestosterone on a teleost, the medaka (*Oryzias latipes*). J Exp Zool 173:279–284.

Hsu CY, Hsu LH, Liang HM. 1979. The effect of cyproterone acetate on the activity of Δ5–3β-hydroxysteroid dehydrogenase in tadpole sex transformation. Gen Comp Endocrinol 39:404–410.

Hunter GA, Donaldson EM. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Fish physiology, vol. 9, pp 223–291, Hoar W.S. and Randall D.J. (eds), Academic Press, New York.

Jost A. 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophysical hormones. Rec Prog Hormone Res 8:379–413.

Kuntz S, Chesnel A, Duterque-Coquilland M, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Dannon C, Flament S, Chardard D. 2003. Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. J Steroid Bioch Molec Biol (in press).

Lance VA, Bogart MH. 1994. Studies on sex determination in the American alligator *Alligator mississipiensis*. J Exp Zool 270:79–85.

Lupo di Prisco C, Delrio G, Chieffi G, Bellini Cardinelli L, Polzonetti Magni A. 1971. Identification and biosynthesis of steroid hormones in the ovary and fat bodies of female *Triturus cristatus carnifex*. Comp Biochem Physiol 40 (B):53–60.

Lupo di Prisco C, Sile CB, Delrio G, Chieffi C. 1972. In vitro metabolism of cholesterol-4-$^{14}$C and testosterone-4-$^{14}$C in testes and fat bodies of *Triturus cristatus carnifex*. Comp Biochem Physiol 41(B):245–249.

Lutz LB, Cole LM, Gupta MK, Kwist KW, Auchus RJ, Hammes SR. 2001. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. Proc Natl Acad Sci USA 98:13728–13733.

Petrini S, Zaccanti F. 1998. The effects of aromatase and 5α reductase inhibitors, antiandrogen, and sex steroids on Bidder's organs development and gonadal differentiation in *Bufo bufo* tadpoles. J Exp Zool 280:245–259.

Pieau C. 1974. Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons *d'Emys orbicularis* L. (chélonien); effets des hormones sexuelles. Ann Embryol Morphol 7:365–394.

Pieau C, Girondot M, Richard-Mercier N, Desvages G, Dorizzi M, Zaborski P. 1994. Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: hormonal involvement. J Exp Zool 270:86–94.

Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. 2001. Temperature dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. In: EXS 91 genes and mechanisms in vertebrate sex determination. Scherer G, Schmid M, eds, pp. 117–141, Bukhauser, Basel, Boston, Berlin.

Piferrer F, Donaldson EM. 1991. Dosage dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Fish Physiol Biochem 9:145–150.

Piferrer F, Baker IJ, Donaldson EM. 1993. Effects of natural, synthetic, aromatizable and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Gen Comp Endocrinol 91:59–65.

Piferrer F, Zanuy S, Carillo M, Solar II, Devlin RH, Donaldson EM. 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. J Exp Zool 270:255–262.

Saidapur SK, Gramapurohit NP, Shanbhag BA. 2001. Effects of sex steroids on gonadal differentiation and sex reversal in the frog, *Rana curtripes*. Gen Comp Endocrinol 124: 115–123.

Scheib D. 1983. Effects and roles of estrogens in avian gonadal differentiation. Differentiation 23 (suppl):587–592.

Vaillant S, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N. 2001. Sex reversal and aromatase in chicken. J Exp Zool 290:727–750.

Van den Hurk R, van Oordt PGW. 1985. Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen Comp Endocrinol 57:216–222.

Wallace H, Badawy GMI, Wallace BMN. 1999. Amphibian sex determination and sex reversal. Cell Mol Life Sci 55:901–909.

Wibbels T, Crews D. 1992. Specificity of steroid hormone induced sex determination in a turtle. J Endocrinol 133:121–129.

Yamamoto T. 1958. Artificial induction of functional sex reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). J Exp Zool 137:227–263.

Yu NW, Hsu CY, Ku HH, Chang LT, Liu HW. 1993. Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione. J Exp Zool 265: 252–257.

Zaborski P. 1986. Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and HY antigen expression in gonads of a newt. In: Progress in Developmental Biology, Part A, pp 163–169. 1986 Alan R. Liss, Inc.

Zaccanti F, Petrini S, Rubatta ML, Stagni AM, Giorgi PP. 1994. Accelerated female differentiation of the gonad by inhibition of steroidogenesis in amphibia. Comp Biochem Physiol 107(A):171–179.

*** Annexe 2**

ELSEVIER

Aquatic Toxicology 64 (2003) 143–153

AQUATIC TOXICOLOGY

www.elsevier.com/locate/aquatox

# Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian)

S. Flament [a,*], S. Kuntz [a], A. Chesnel [a], I. Grillier-Vuissoz [a], C. Tankozic [a], M. Penrad-Mobayed [b], G. Auque [c], P. Shirali [d], H. Schroeder [e], D. Chardard [a]

[a] *Faculté des Sciences, EA3442 Génétique, Signalisation, Différenciation, Université Henri Poincaré, Entrée 1B, 9ème étage, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France*

[b] *Biochimie du Développement, Institut Jacques Monod, Paris, France*

[c] *Institut de Santé au Travail, Lille, France*

[d] *Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque, France*

[e] *Biologie du Comportement, Université Henri Poincaré, Nancy I, France*

Received 29 July 2002; received in revised form 28 January 2003; accepted 29 January 2003

**Abstract**

In the amphibian *Pleurodeles waltl*, steroid hormones play a key role in sex differentiation. Since cadmium has been reported to block receptors of sex steroid hormones, we analyzed the effects of this heavy metal on *Pleurodeles* larvae gonadogenesis. At stage 42, larvae die in the presence of 10.9 μM Cd in the rearing tap water, with $TL_{50}$ of 46.3 h, but the concentration of 5.5 μM is tolerated for more than 60 days. When used at 5.5 μM cadmium accumulation measured by atomic absorption spectrophotometry (AAS) in total homogenates of larvae at stage 54 (after 77 days of exposure to the heavy metal) reached 58.1 μg/g of dry weight. At stage 54, we did not detect inhibitory effects on gonadogenesis in larvae reared in the presence of 5.5 μM Cd since stage 42. When the exposure to 5.5 μM Cd was lengthened after stage 54, metamorphosis was delayed and could not be completed. When larvae were exposed to 10.9 μM Cd from stage 54, metamorphosis did not occur and gonad development was stopped. Our study demonstrates a lack of a direct effect of cadmium on sex determination-differentiation but a strong inhibitory effect on metamorphosis, which impairs further gonadal development.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Cadmium; Sex determination; Sex differentiation; Metamorphosis; Amphibian

## 1. Introduction

The newt *Pleurodeles waltl* possesses genetic sex determination and obeys female heterogamety: females with ZW chromosomes, males with ZZ. The genotype can be deduced from the analysis of peptidase 1 since this dimeric and polymorphic

* Corresponding author. Tel.: +33-3-83-68-42-52; fax: +33-3-83-903277.

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

0166-445X/03/$ - see front matter © 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/S0166-445X(03)00042-0

enzyme is encoded by two codominant genes: pep1A on chromosome Z and pep1B on chromosome W (Ferrier et al., 1980).

Once sex determination mechanisms are activated, primary sex differentiation ensues. In *P. waltl*, like in most of non mammalian vertebrates, steroid hormones are involved in sex differentiation. When treated by estradiol benzoate during the hormone sensitive period, ZZ individuals differentiate into functional neo-females (Gallien, 1950; Chardard et al., 2003). Sex reversal of ZW larvae may be obtained by application of dihydrotestosterone (Chardard et al., 2003). Before any histological sign of differentiation, the gonadal activity of the estrogen synthesizing enzyme aromatase is higher in genetic female larvae than in genetic males (Chardard et al., 1995). Moreover, treatment with an aromatase inhibitor has been shown to induce sex reversal in ZW larvae (Chardard and Dournon, 1999).

The gonads originate from an out-pocket of cells on the ventral surface of the kidney (mesonephros) and consists of both somatic and germ cells. Initially, there is no difference between males and females. In females, the cortical part develops and includes large follicles while the medulla regresses, leaving a lacuna, which can be easily observed on histological analysis. The progression toward male phenotype is characterized by development of the medulla and cortical regression. In *Pleurodeles*, stage 53 is the first stage at which the sex of the gonad may be ascertained by a histological examination. A direct observation of the gonads after dissection may also lead to the identification of either testis or ovary, but this examination can be performed only after metamorphosis which occurs at stage 55 under the control of thyroid hormones and ends at stage 56. Metamorphosed animals are easily identified by disappearance of their external gills and regression of their caudal fin.

The role of steroids is also demonstrated in cases of temperature-induced sex reversal. When they are reared from stage 42 to 54 (thermosensitive period) at 32 instead of 20 °C, larvae of female genotype (ZW) become fertile phenotypic males (Dournon and Houillon, 1984). Treatment with estradiol benzoate counteracts the masculinizing effects of high temperature on ZW individuals (Zaborski, 1986). In heat treated animals, aromatase activity does not increase up to the level that is usually observed in ZW animals (Chardard et al., 1995) and this is related in part to a decrease in aromatase expression (Kuntz et al., 2003). The main steps of *P. waltl* development are shown in Fig. 1.

Since estrogens and androgens play an important role in gonadogenesis, pollutants that modify the steroid pathway could potentially modify differentiation of the gonad. The heavy metal cadmium could possess such an effect. Indeed, cadmium is readily incorporated in the kidneys and reproductive tissues (Kostial, 1986). Besides, cadmium mimics the effects of estradiol in estrogen-responsive breast cancer cell lines via an interaction with the estrogen receptor α (Stoica et al., 2000). In rainbow trout, cadmium can inhibit estrogen receptor activity (Le Guevel et al., 2000). Cadmium can also activate androgen receptors in human prostate cancer cells (Martin et al., 2002). Nevertheless, even if the toxic effects of cadmium on aquatic organisms have been well documented, much more data are available for fishes and anuran amphibians than for urodeles.

The aim of this study was to determine if cadmium exposure of *Pleurodeles* larvae could counteract their gonadal differentiation.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and treatments

Larvae obtained from crosses between ZZ males and ZW females were staged according to the developmental stages described by Gallien and Durocher (1957). All larvae were reared at ambient temperature (20±2 °C). Then, in a first set of experiments, treatments were performed between stage 42 and 54. Some animals were bred at ambient temperature in tap water while others were bred in tap water containing various concentrations of cadmium chloride. Water (with or without cadmium) was replaced three times a week after feeding of the larvae. For each treatment, the concentration of cadmium in water was calculated

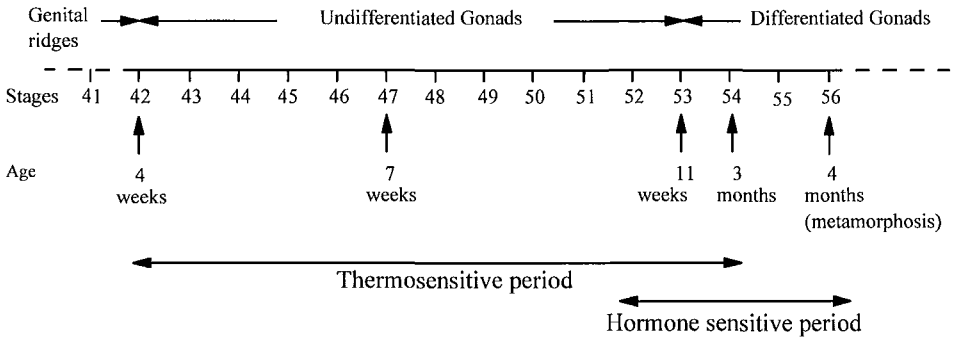



Fig. 1. Development of *P. waltl*. The main events in the development of genital apparatus are shown. The evolution of gonads follows three steps: genital ridges, undifferentiated gonads and a well differentiated organ corresponding either to a testis or an ovary. Sex reversal may occur either following heat treatment of genetically female larvae (ZW) from stage 42 to 54 which is the thermosensitive period or following treatment of genetically male larvae (ZZ) with estrogens during the hormone sensitive period (from stage 52 to 56). Metamorphosis occurs at stage 56. The age of the animals is indicated approximately at several stages.

but it was not always measured by atomic absorption spectrophotometry (AAS).

An other set of experiments was performed up to stage 56, which is characterized by a complete metamorphosis of the animals. This treatment included the hormone sensitive period for sex reversal. In some cases, thyroxin was added to the tap water at 30 nM to induce metamorphosis in the presence or absence of cadmium.

### 2.2. Cadmium measurements

Animals were washed twice in tap water before anesthesia (benzocaine) and homogenized in distilled water (total homogenates). Alternatively, organs (brain, intestine, kidney, liver, lung, ovary, spleen) were dissected and homogenized in distilled water. After lyophilization and weighing, samples were digested with 3 ml of nitrosulfuric acid until complete mineralization. Cadmium contents were quantified with a Perkin–Elmer 4000 atomic absorption spectrophotometer at the wavelength of 228.8 nm. The detection limit was 1 μg $Cd^{2+}$/l. Calibrations were performed using a standard solution for AAS.

### 2.3. Determination of sexual genotype and phenotype

For sexual genotype analysis, the extremity of the tail was removed from anaesthetized larvae and homogenized in 50 mM Tris–HCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 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).

Then, each animal was fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin and sectioned at 7 μm. Sections were stained with hematoxylin and eosin. The sexual phenotype observed from the histological examination was compared with the genotype.

### 2.4. Statistical analysis

Data about cannibalism, metamorphosis and mortality were expressed as proportions and were analyzed by means of non-parametric procedures ($\chi^2$-test and Fisher exact test) (Siegel and Castellan, 1988). Results of time lethal 50, dry weight of animals and cadmium accumulation were expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analysis was performed using ANOVA and Student–Newman–Keuls multiple comparison procedures except for dry weight data which were compared by means of a Student's *t*-test (Winer, 1971).

All statistical analyses were performed using the SPSS 9.0 software (SPSS Inc., USA).

## 3. Results

### 3.1. Cadmium toxicity

First, we searched for the highest dose of cadmium that could be tolerated by stage 42 larvae for at least 2 months (stage 54) since the effects of the different treatments should be analyzed after the differentiation of the gonads. We analyzed the time lethal 50 ($TL_{50}$) which is the time required for cadmium to induce the mortality of 50% of the animals. We observed that in the presence of 27.3 μM Cd (5 mg/l $CdCl_2$), $TL_{50}$ was $12.3 \pm 1.5$ h ($n = 60$, three experiments) whereas $46.3 \pm 0.9$ h were required with 10.9 μM Cd ($n = 60$, three experiments). When exposed to 5.5 μM Cd (1 mg/l $CdCl_2$), no mortality occurred for at least 60 days ($n = 60$, three experiments). So, most of the experiments were performed using 5.5 μM of Cd.

The toxicity of cadmium could be demonstrated by two effects. First, the dry weight of treated larvae was lower than those of control animals. At stage 54, the dry weight of control larvae was $41.6 \pm 3.6$ mg ($n = 4$) whereas in the case of larvae exposed to 5.5 μM Cd from stage 42, it was $78.8 \pm 4.1$ mg ($n = 4$) (significantly different from controls, $P < 0.01$, $\chi^2$-test). Besides, we observed a modification of the behavior of the larvae in the presence of cadmium: there was a strong decrease of cannibalism. Indeed, larvae often eat the limbs of their congeners in the same tank. For instance, in control conditions, when 20 larvae of stage 42 lived in the same tank up to stage 54, 100% of them had at least one limb bitten off while more than 50% had lost two limbs. In the presence of 5.5 μM Cd, in the same conditions of density (20 larvae), 75% of the animals still possessed their four limbs and 25% had only one affected limb (significantly different from controls, $P < 0.01$, $\chi^2$-test). When we observed the number of fingers per limb that is the main criteria to determine the developmental stage (Gallien and Durocher, 1957), we did not observe a significant difference between Cd treated (5.5 μM) and control larvae.

Then we verified that cadmium accumulation really occurred in *P. waltl*. The heavy metal was measured by AAS. One measurement was performed on a juvenile female (stage 56) exposed to 27.3 μM Cd for 12 months. The results showed that cadmium accumulation occurred preferentially in kidney (317 μg/g dry weight), intestine (178 μg/g) and liver (83 μg/g) while low amounts were found in organs such as the brain, ovary, spleen and lung. Several measurements were performed in total larvae homogenates (Table 1). In animals that had been exposed to water containing 5.5 μM of the heavy metal for 31 days, $248.4 \pm 15.7$ ng of cadmium, i.e. around 118 μg of Cd per g of dry weight, were measured. These values reached $2342.5 \pm 63.7$ ng (around 58 μg/g dry weight) in animals exposed to the same concentration for 77 days. A lower extent in cadmium accumulation was observed in the presence of 0.55 μM Cd even if significantly higher than control values. Control animals reared for the same time in tap water did not accumulate significant amount of the heavy metal.

### 3.2. Cadmium and sex determination-differentiation

Since cadmium was able to accumulate in *Pleurodeles* larvae, we analyzed potential effects of the heavy metal on sex determination-differentiation. Larvae obtained from normal offsprings (ZZ male crossed with a ZW female) were reared in tap water containing 5.5 μM Cd from stage 42. One month after the beginning of the experiment, when most of the animals had reached stage 50, several larvae were subjected to a histological analysis in order to determine if gonadogenesis was similar to that of control animals. At this stage, the gonad was more developed than those of animals at stage 42 (Fig. 2B; 1, 2, 5), germ cells could be observed together with somatic cells and as expected, the gonad was still undifferentiated and we could not discriminate between ovary and testis (Fig. 2B; 3, 6). There was no difference between control and cadmium-treated animals. At the end of stage 54 (77 days after the beginning of the experiment), other larvae were analyzed in order to determine if their sexual phenotype was correlated to their genotype. The analysis of peptidase-1 showed the usual electrophoretic pattern made of three spots for ZW individuals

Table 1
Cadmium accumulation in *Pleurodeles* larvae

| Day of analysis | Treatment between stage 42 and 54 | Cadmium/animal (ng)[a] | Cadmium/animal (μg/g of dry weight)[a] |
|---|---|---|---|
| D 31 | Control | 1.6±0.8 | 0.3±0.03 |
| | 0.55 μM Cd | 175.3±58.1* | 28.5±4.9* |
| | 5.5 μM Cd | 248.4±15.7* | 117.9±4.3* |
| D 77 | Control | 12.5±1.6 | 0.16±0.03 |
| | 0.55 μM Cd | 618.8±42.1* | 9.8±0.7* |
| | 5.5 μM Cd | 2342.5±63.7* | 58.1±6.5* |

*, Significantly different ($P < 0.05$) from controls based on ANOVA and Student–Newman–Keuls comparison procedures.
[a] Results are mean±S.E.M. of measurements performed on three different larvae.

(peptidase-1 is dimeric and appears either as AA, AB or BB isoforms) whereas only one spot was detected in ZZ individuals (AA isoform) (Fig. 2A). For all the larvae analyzed, the sexual genotype was correlated to the sexual phenotype on histological sections. Indeed, at this stage, gonads were differentiated and we could easily discriminate between an ovary which possessed a central lacuna and germ cells at the periphery of the organ, and a testis in which germ cells were located in the central part (Fig. 2B; 4, 7).

### 3.3. Cadmium and metamorphosis

Even if gonadogenesis appeared unaffected by cadmium exposure, post-larval development of the gonad as well as its physiology might be disturbed in such animals. Consequently, cadmium exposure, which started at stage 42, was lengthened after stage 54. We observed that metamorphosis was affected in that case. We were interested in $TM_{50}$ that is the time required for 50% of the animals to reach stage 55b, which is characterized by a reduction of the gills up to 50%. In the presence of 0.55 μM Cd, we observed a very little delay in metamorphosis: $TM_{50}$ of 178.3±36.8 versus 173±35.7 days in control animals. In the presence of 5.5 μM of the heavy metal $TM_{50}$ increased up to 199.3±38.9 days (115% of control) but it was not significantly different from controls (Table 2). In addition, we observed that larvae exposed to 5.5 μM Cd from stage 42 failed to metamorphose: 100% of them die at stage 55b (Table 2). In order to determine if this mortality was related to cadmium accumulation after stage 42 or to the presence of cadmium in the water during metamorphosis, we used thyroxine. When this hormone was added simultaneously with 5.5 μM Cd to the water of stage 54 *Pleurodeles* larvae that had never been exposed to the heavy metal previously, mortality at stage 55b was still observed. Besides, when larvae were reared in tap water containing 5.5 μM Cd between stages 42 and 54, and then in tap water without the heavy metal, no problem occurred during metamorphosis. So, our results revealed an acute toxicity of cadmium during metamorphosis of *P. waltl*. Such acute toxicity was restricted to the period of metamorphosis since doses over 5.5 μM such as 27.3 μM, were tolerated by metamorphosed animals for more than 60 days.

Since at stage 54, the weight of the larvae was higher when compared with stage 42, we analyzed the effects of higher doses of cadmium chloride at this stage. The concentration of 27.3 μM appeared to be lethal and could not be used. When larvae were exposed at stage 54 to 10.9 μM Cd, although 100% of control larvae were metamorphosed 120 days after the beginning of the experiment, cadmium treated larvae still had a typical larval aspect 150 days later with external gills and a well developed caudal fin (Table 3 and Fig. 3A). The absence of metamorphosis was confirmed by a histological study of the tail showing the presence of numerous Leydig cells in the epiderm (these cells disappear during metamorphosis) (Fig. 3B and C) (Kelly, 1966). So, this treatment induced a significant delay in metamorphosis of at least 5 months. As expected, the analysis of the gonads at this stage revealed a very small size in cadmium-

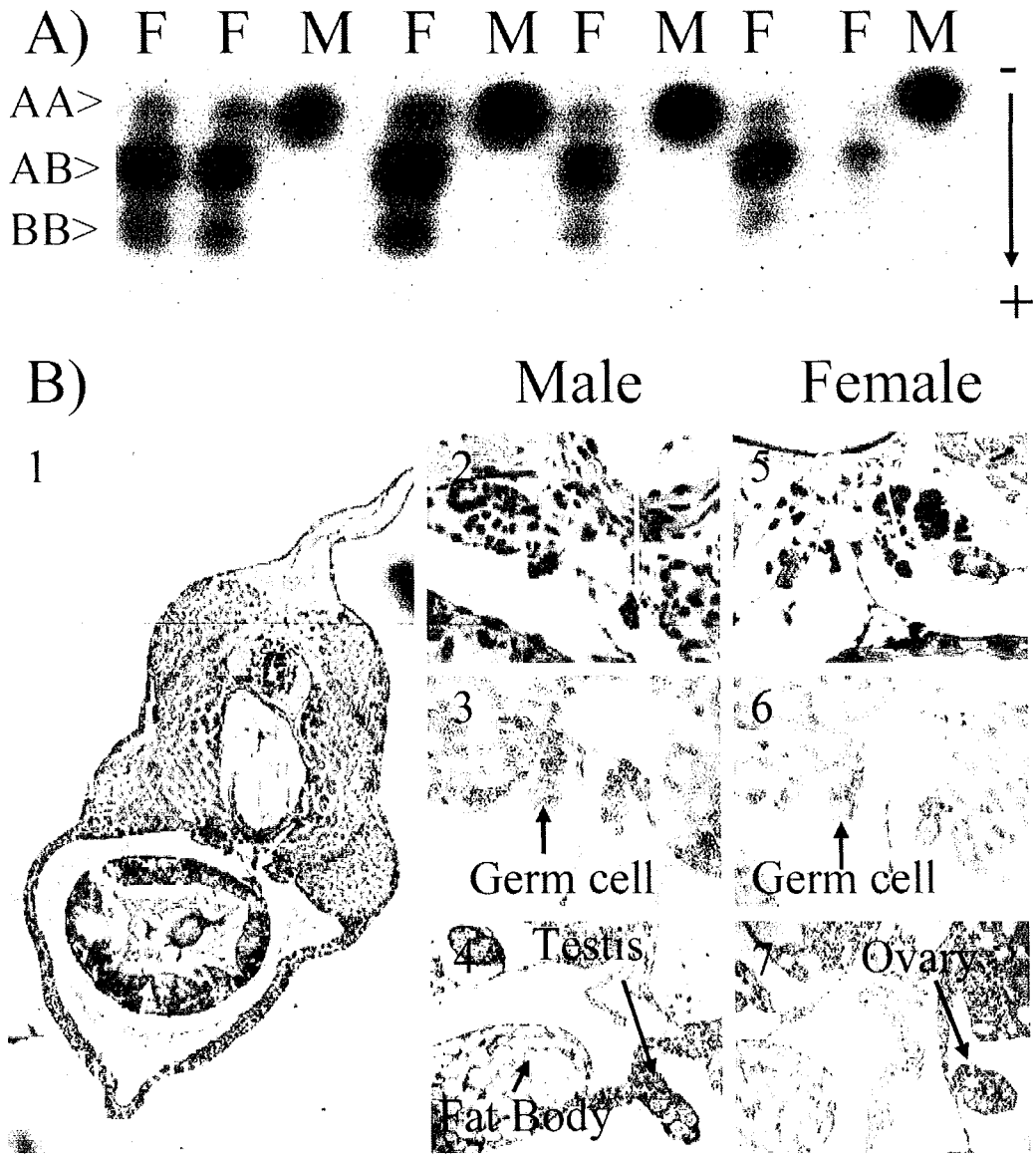



Fig. 2. Analysis of sexual phenotype and genotype of larvae exposed to Cd. (A) Example of ten larvae at stage 54, randomly chosen in a batch of larvae treated with 5.5 μM Cd since stage 42. In ZW individuals, genetically females (F), peptidase-1 appears as three spots on the gel (homodimers AA and BB as well as the heterodimer AB). In ZZ larvae, genetically males (M), only one spot is detected corresponding to the homodimer AA. (B) Histological sections of larvae exposed to 5.5 μM Cd. (1) At stage 42, at a low magnification, on a transversal section, gonads appear as two out-pockets of cells on the ventral surface of the kidney. The intestine is shown in the abdominal cavity. Higher magnifications of sections showing the gonads of male (2–4) or female (5–7) larvae exposed to 5.5 μM Cd. Gonads are very small at stage 42 (D0. 2,5) and more developed at stage 50 (D31. 3,6) but there is no difference between males and females whose genotype had been established previously by peptidase-1 analysis. At the end of stage 54 (D77), an ovary is detected in genetic females (7) while a testis is present in genetic males (4). Magnification is × 50 in photograph 1, × 160 in photographs 2, 3, 5, 6 and × 100 in photographs 4 and 7.

Table 2
Influence of a low dose of cadmium on metamorphosis of *Pleurodeles* larvae

| Treatment | Control | 5.5 μM Cd |
|---|---|---|
| Number of larvae at stage 42[a] | 34 | 34 |
| Mortality before stage 55b[a] | 7 | 12 |
| Number of larvae at stage 55b[a] | 27 | 22 |
| Time required to reach stage 55b (days)[b] | 173± 35.7 | 199±38.9 |
| Number of larvae at stage 56[a] | 27 | 0** |

**, Significantly different from controls ($P < 0.01$, $\chi^2$-test).
[a] The results are cumulated numbers from three different experiments.
[b] The results are mean±S.E.M. ($n = 3$). The time was measured from the first day of cadmium exposure at stage 42.

Table 3
Influence of a high dose of cadmium on metamorphosis of *Pleurodeles* larvae

| Treatment | Control | 10.9 μM Cd |
|---|---|---|
| Number of larvae at D0 (stage 54) | 10 | 10 |
| Metamorphosed larvae at D50 | 5 | 0* |
| Metamorphosed larvae at D120 | 10 | 0** |
| Metamorphosed larvae at D270 | 10 | 0** |

*, Significantly different from controls ($P < 0.05$, Fisher exact test); **, significantly different from controls ($P < 0.01$, Fisher exact test).

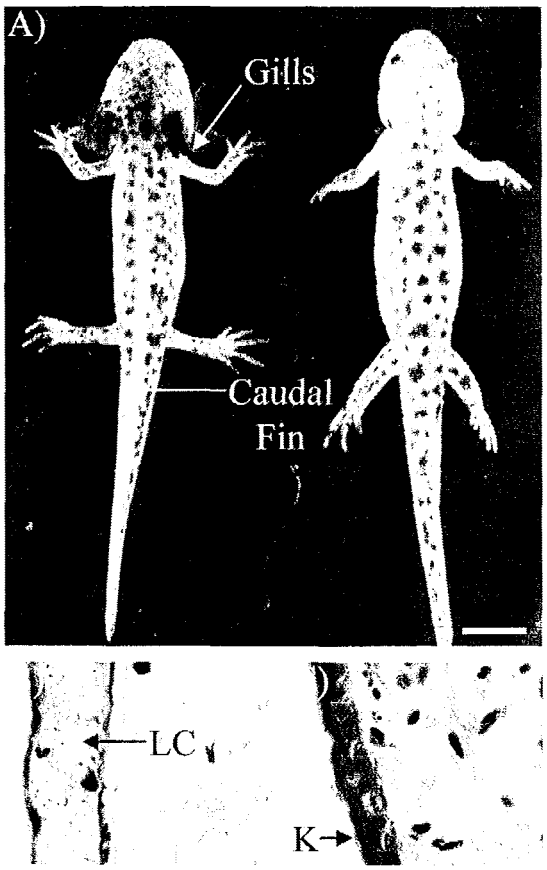



Fig. 3. Effect of cadmium on metamorphosis of *P. waltl* larvae. In the presence of 10.9 μM Cd from stage 54, metamorphosis was strongly delayed. The two animals in (A) are shown 270 days after the beginning of the experiment. The animal on the right, reared in tap water (control), is already metamorphosed whereas the animal on the left, exposed to $CdCl_2$, still appears as a larva: external gills and caudal fin are well developed. On tail sections, numerous Leydig cells (LC) are present in the epiderm of cadmium treated animals (B). These cells are not found in the keratinized epiderm (K, keratin) typical of the metamorphosed animal (C). Bar is 1 cm in (A) and 25 μm in (B) and (C).

treated animals with very little fat body in comparison with metamorphosed animals, which were the same age (not shown).

## 4. Discussion

The results of our study performed on *P. waltl* give more informations about cadmium toxicity during the development of larvae of this urodele amphibian species. In addition, they demonstrate that exposure of the larvae to cadmium does not affect the primary step of gonadogenesis but strongly inhibits metamorphosis and consequently further gonadal development.

### 4.1. Cadmium toxicity

First, we analyzed the toxicity of cadmium on *Pleurodeles* larvae since only one experiment has been performed on this model to our knowledge. The authors studied the effects of the heavy metal on very early stages of development (Calevro et al., 1998). They applied various concentrations of

cadmium from stage four up to hatching (170 h) and observed developmental abnormalities at low doses whereas development was arrested at the neurula stage in the presence of 50 μM of Cd. In the present study, we show that, when applied at later stages of development, cadmium is still highly toxic. At stage 42, in the presence of 27.3 μM Cd, 50% mortality was observed after 12.3 h ($TL_{50}$) whereas the same result was observed after 46.3 h in the presence of 10.9 μM. The highest concentration that was tolerated by the larvae at this stage was 5.5 μM. In comparison, tadpoles of the anuran *Xenopus laevis* appear more sensitive to the heavy metal. Indeed, $LC_{50}$/72 h was 2.2 μM (0.25 mg Cd/l) at stage 40 (Herkovits et al., 1998). It should be noticed that the concentrations of Cd that are described in our study are calculated concentrations, which could not reflect the bio-available ones. As an attempt to evaluate this, cadmium content was measured by AAS in three samples of tap water containing 5.5 μM Cd (0.6 mg Cd/l). This analysis revealed a cadmium content of 0.4 instead of the 0.6 mg/l deduced from the theoretical calculation. This might be explained by sorption of cadmium either on the walls of the tank or on organic compounds found in tap water.

In the presence of Cd, we observed a lower increase in the weight of the larvae. Indeed, at stage 54, the dry weight measured after lyophilization of total larvae homogenates was around 47% of those of control larvae. Such a difference might be the result of an effect of cadmium on cell division. Indeed there are several reports about an antagonistic action of cadmium on cell cycle. For instance, cadmium inhibits liver regeneration in rats subjected to partial hepatectomy (Theocharis et al., 1998). Besides, the G2/M transition of cell cycle is highly sensitive to cadmium (Chao and Yang, 2001). One might also propose that this difference in the weight of the animals might be due to a loss of appetite. This hypothesis might explain the higher percentage of animals having intact limbs in the presence of Cd versus control ones. Whatever the reason for such a difference in the weight of the larvae, we observed carefully the transitions from one stage to the next one, which are characterized by the number of fingers at anterior or posterior limb, according to the developmental table. We did not detect a significant delay in the time required for treated larvae to reach stage 54 (not shown). So, even if cadmium modified cell proliferation, cell differentiation might be unaffected.

The measurements that we have performed revealed an accumulation of the heavy metal in *Pleurodeles* larvae. It was interesting to analyze the cadmium bio-accumulation factor (BF), which is the ratio of its concentration in tissue versus its concentration in the experimental maintaining media. BF was 467 after 31 days of exposure to 0.55 μM Cd but BF was only 193 for larvae exposed for the same time to 5.5 μM Cd. BF was 160 after 77 days of treatment with 0.55 μM Cd and 95 in the presence of 5.5 μM. These results showing that BF was higher in larvae exposed to the lower cadmium concentration, are consistent with data previously obtained for *X. laevis* (Herkovits et al., 1998). This fact confirms that amphibians could play an important role in the bio-magnification process even when they are exposed to very low cadmium concentrations in the environment.

### 4.2. Gonadogenesis

Interactions between cadmium and receptors of steroid hormones have been described (Le Guevel et al., 2000; Stoica et al., 2000; Martin et al., 2002) and this might impair gonadogenesis since steroids play an important role in sex differentiation in non mammalian vertebrates. However, we did not observe any difference in gonadogenesis between cadmium-treated and control larvae. At the end of stage 54, the differentiation of the gonad appeared normal both in males and females and was always correlated to the sexual genotype determined by peptidase-1 analysis. This strongly suggests that cadmium does not interact with sex steroid pathways in *P. waltl*, at least at the concentrations we used (5.5 μM). The mean by which Cd interacts with steroid receptors in other models is not well understood. Exposure to this heavy metal is known to induce the synthesis of heat shock proteins (HSP) (Ait-Aissa et al., 2000; Gaubin et al., 2000). These proteins interact with estrogen or

androgen receptors (Pratt and Toft, 1997) and could be involved in the cadmium-induced alteration of the steroid pathways. The changes in HSP synthesis following Cd exposure vary according to species and one might suggest that the lack of effect of Cd on *P. waltl* gonadogenesis might be related to such a difference. Therefore, the study of HSP synthesis in *P. waltl* following Cd exposure might be of interest.

### 4.3. Metamorphosis

Even if there was no effect on sex differentiation, this did not mean that post-larval development of the gonad as well as its physiology could not be modified. So, cadmium exposure was lengthened after stage 54. This allowed us to observe an inhibitory effect of cadmium on metamorphosis of *Pleurodeles* larvae. The time required for 50% of the animals to reach stage 55b ($TM_{50}$) increased in case of exposure to 5.5 μM Cd. Moreover, we could observe that at stage 54 (just before stage 55 at which metamorphosis begins), the use of higher doses of Cd induced a very long delay in metamorphosis. For instance, exposure to 10.9 μM Cd maintained larvae at stage 54 for at least 9 months whereas 100% of control animals were metamorphosed after 4 months. A similar effect has recently been reported in *X. laevis* when tadpoles were exposed to Cd for 14 days from stage 60: the rate of tail resorption was inhibited (Fort et al., 2000). Therefore, cadmium is probably involved in the delayed metamorphosis observed when *Rana luteiventris* tadpoles were exposed to soil samples known to be contamined by several heavy metals (Lefcort et al., 1998).

In the anuran *X. laevis*, the delay is due to a reduced level of triiodothyronin (Fort et al., 2000). In our urodele model, the reason for the delay is probably similar. One might propose that the delay of metamorphosis is only related to a delay of growth but we disagree with this idea for at least three reasons. First, as described before, even if the weight of larvae exposed to cadmium was lower than those of control animals, we did not observe a significant delay for the treated larvae to reach the different developmental stages when compared with controls. Second, we could observe that at stage 54 (just before stage 55 at which metamorphosis begins), the use of higher doses of Cd induced a very long delay in metamorphosis. Such larvae have at least a 5 months delay in metamorphosis and their size is higher than those at which metamorphosis usually occurs. Lastly, although we did not measure the concentration of thyroid hormones in the larvae, administration of thyroxin was able to induce the beginning of metamorphosis despite the presence of cadmium. Hence, thyroid hormone receptors did not appear modified. Taken together, these observations strongly suggest a defect in thyroid hormones pathway rather than a growth defect.

Besides, we observed that the presence of cadmium was highly toxic during the period of metamorphosis and we could not analyze the physiology of the gonads using a continuous exposure to 5.5 μM Cd since larvae died at stage 55b. However, after metamorphosis, higher concentrations were well tolerated by juvenile individuals (more than 60 days for 27.3 μM). The reason for such a toxicity during metamorphosis is not known. One might suggest that cadmium accumulation could be higher during metamorphosis. Indeed, many changes occur in metamorphosing larvae, such as tail regression via apoptotic mechanisms. These remodeling tissues might be sites at which entry of the heavy metal could be facilitated.

## 5. Conclusion

In conclusion, our study gives data about cadmium toxicity in the urodele *P. waltl*. Even if anuran are most often used to study the effects of heavy metals, urodeles are also targets of this pollutant. Our results demonstrate a lack of effect of this heavy metal on sex differentiation in this species but a great inhibitory effect on metamorphosis. The toxicity during metamorphosis might help to establish a test to evaluate the impact of environmental agents as recently attempted using *X. laevis* (Fort et al., 2000).

## Acknowledgements

We would like to acknowledge Dr Jean-Louis Merlin and Dr Marie-Helene Teiten for the use of a microscope to get digital images of histological sections, Philippe Collet and Dr Anne-Marie Bautz for scanning of figures, Alain Iuretig for helping in rearing *Pleurodeles* and Martine Callier for technical assistance in histological studies. 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 des Vosges' and of the 'Association pour la Recherche sur le Cancer'. Sandra Kuntz was recipient of a grant from the French 'Ministère de la Recherche'.

## References

Ait-Aissa, S., Porcher, J., Arrigo, A., Lambre, C., 2000. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. Toxicology 145 (2–3), 147–157.

Calevro, F., Campani, S., Ragghianti, M., Bucci, S., Mancino, G., 1998. Tests of toxicity and teratogenicity in biphasic vertebrates treated with heavy metals ($Cr^{3+}$, $Al^{3+}$, $Cd^{2+}$). Chemosphere 37 (14–15), 3011–3017.

Chao, J.I., Yang, J.L., 2001. Opposite roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in cadmium-induced genotoxicity and mitotic arrest. Chem. Res. Toxicol. 14 (9), 1193–1202.

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

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., Kuntz, S., Chesnel, A., Flament, S., 2003. Effects of androgen on sex differentiation of the urodele Pleurodeles waltl. J. Exp. Zool. 296A, 46–55.

Dournon, C., Houillon, C., 1984. Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'amphibien urodèle: *Pleurodeles waltlii* Michah. Reprod. Nutr. Dév. 24, 361–378.

Dournon, C., Collenot, A., Lauthier, M., 1988. Sex-linked peptidase-1 patterns in *Pleurodeles waltlii* Michah (urodele amphibian): genetic evidence for a new codominant allele of ZZ, ZW and WW sexual genotypes. Reprod. Nutr. Dév. 25, 671–688.

Ferrier, V., Jaylet, A., Cayrol, C., Gasser, F., Buisan, J.J., 1980. Etude électrophorétique des peptidases érythrocytaires chez *Pleurodeles waltlii* (amphibien, urodèle): mise en évidence d'une liaison avec le sexe. C.R. Acad. Sci. Sér. D 290, 571–574.

Fort, D.J., Rogers, R.L., Morgan, L.A., Miller, M.F., Clarck, P.A., White, J.A., Paul, R.R., Stover, E.L., 2000. Preliminary validation of a short-term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis*. J. Appl. Toxicol. 20, 419–425.

Gallien, L., 1950. Inversion du sexe (féminisation) chez l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. Traité par le benzoate d'oestradiol. C.R. Acad. Sci. Paris 231, 919–920.

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

Gaubin, Y., Vaissade, F., Croute, F., Beau, B., Soleilhavoup, J., Murat, J., 2000. Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. Biochim. Biophys. Acta 1495 (1), 4–13.

Herkovits, J., Cardellini, P., Pavanati, C., Perez-Coll, C.S., 1998. Cadmium uptake and bioaccumulation in *Xenopus laevis* embryos at different developmental stages. Ecotoxicol. Environ. Safety 39 (1), 21–26.

Kelly, D.E., 1966. The Leydig cell in larval amphibian epidermis. Fine structure and function. Anat. Rec. 154 (3), 685–699.

Kostial, K., 1986. Cadmium. In: Underwood, E.J. (Ed.), Trace Elements in Human and Animal. Academic Press, Orlando, pp. 319–343.

Kuntz, S., Chesnel, A., Duterque-Coquillaud, M., Grillier-Vuissoz, I., Callier, M., Dournon, C., Flament, S., Chardard, D., 2003. Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt Pleurodeles waltl. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 84 (1), 91–100.

Lefcort, H., Meguire, R.A., Wilson, L.H., Ettinger, W.F., 1998. Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35 (3), 447–456.

Le Guevel, R.L., Petit, F.G., Goff, P.L., Metivier, R., Valotaire, Y., Pakdel, F., 2000. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. Biol. Reprod. 63 (1), 259–266.

Martin, M.B., Voeller, H.J., Gelmann, E.P., Lu, J.M., Stoica, E.G., Hebert, E.J., Reiter, R., Singh, B., Danielsen, M., Pentecost, E., Stoica, A., 2002. Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. Endocrinology 143 (1), 263–275.

Pratt, W.B., Toft, D.O., 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. Endocr. Rev. 18, 306–360.

Siegel, S., Castellan, N.J., 1988. Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill.

Stoica, A., Katzenellenbogen, B.S., Martin, M.B., 2000. Activation of estrogen receptor-a by the heavy metal cadmium. Mol. Endocrinol. 14, 545–553.

Theocharis, S.E., Margeli, A.P., Spiliopoulou, C., Skaltsas, S.D., Koutselinis, A., 1998. Putrescine administration reverses cadmium-associated inhibition of liver regeneration. Dig. Dis. Sci. 43 (8), 1732–1736.

Winer, B.J., 1971. Statistical Principles in Experimental Design. McGraw-Hill.

Zaborski, P., 1986. Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and HY antigen expression in gonads of a newt. In: Progress in Developmental Biology, Part A, pp. 163–169. Alan R. Liss Inc.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
**DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL**
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Madame Solange MAGRE, Sous-directeur de laboratoire,Université Pierre et Marie Curie, Paris V

Madame Corinne COTINOT, Directeur de Recherche, INRA, Jouy-en-Josas

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame KUNTZ Sandra

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

« Etude des gènes de la sexualisation de la gonade chez Pleurodeles waltl »

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « sciences agronomiques »

Fait à Vandoeuvre, le 07 juin 2004
Le Président de l'I.N.P.L.,
L. SCHUFFENECKER

TEL 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

# RESUME

Chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*, le déterminisme génétique du sexe est influencé par la température : les larves génétiquement femelles évoluent en mâles fertiles lors d'un élevage à 32°C pendant la période thermosensible (stades 42-54). L'aromatase, enzyme qui synthétise les œstrogènes, joue un rôle clef dans la différenciation femelle. Notre but initial était de déterminer si les différences d'activité enzymatique observées lors de la différenciation sexuelle (stade 52) étaient liées à des différences d'expression. L'ADNc de l'aromatase a été isolé. L'expression est plus importante chez les femelles témoins que chez les mâles ou les femelles chauffées. Cependant, par rapport à l'activité, cette différence est faible et s'observe tardivement (stade 54). Des modifications post-transcriptionnelles interviennent donc vraisemblablement en plus des modifications transcriptionnelles. Pour expliquer ces dernières, nous avons étudié d'autres gènes susceptibles d'agir en amont de l'aromatase. Les ADNc de Sf1, Dmrt1 et Sox9 ont été isolés. Leur expression dans les complexes gonades-mésonéphros est précoce (stade 42). Au stade 55, Sf1 est surexprimé chez les femelles mais cela est postérieur aux changements qui affectent l'aromatase, suggérant une régulation de Sf1 par les œstrogènes. Dmrt1 fait l'objet d'un épissage alternatif chez les larves et l'expression est plus forte dans les gonades femelles au stade 55. A l'état juvénile, l'expression cesse dans l'ovaire alors qu'elle est spécifique du testicule chez les mâles. Sox9 ne présente pas d'expression différentielle au cours du développement. Par ailleurs, les analyses portant sur Sf1 et l'aromatase au niveau cérébral sont en désaccord avec un rôle de cet organe comme relais dans la différenciation gonadique.

---

Mots clés : *Pleurodeles waltl*, détermination sexuelle, differenciation sexuelle, aromatase, Sf1, Dmrt1, Sox9, cerveau.

---

In the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*, the genetic sex determination is influenced by temperature : genetically female larvae develop in fertile males when bred at 32°C during the thermosensitive period (stages 42-54). Aromatase, the estrogens enzyme synthesising, plays a key role in female gonadal differentiation. Our initial goal was to determine if the rise of aromatase activity observed at the onset of sexual differentiation (stage 52) was related to an up regulation of expression. The cDNA of aromatase was isolated. Its expression is more important in control females than in males or in heated females. However, compared to enzyme activity, this difference is weak and is delayed (stage 54). Thus, post-transcriptionnal modifications could be involved in addition to transcriptional regulation. Genes that are supposed to act upstream of aromatase were then studied. The cDNA of Sf1, Dmrt1 and Sox9 were isolated. Their expression in the complexes gonads-mesonephros is detected as early as stage 42. At stage 55, Sf1 is overexpressed in female gonads. So these changes appear after those affecting aromatase expression, suggesting a regulation of Sf1 by estrogens. Dmrt1 is alternatively spliced at larval stages and its expression is stronger in female gonads at stage 55. In juvenile larvae, the expression stops in ovary and becomes testis-specific. Sox9 does not present any differential expression during gonad development. In addition, analyses of Sf1 and aromatase expression in brain disagree with a role of central nervous system as a relay during gonadal differentiation.

---

Keys words : *Pleurodeles waltl*, sex determination, sex differentiation, aromatase, Sf1, Dmrt1, Sox9, brain.

---