

Université de Montréal

**ÉTUDES COMPARATIVES, ÉVOLUTIVES ET RECHERCHE DE GÈNES
IMPORTANTES POUR LA DÉTERMINATION DU SEXE CHEZ LES
MAMMIFÈRES**

par

Alexandre Boyer

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biologie moléculaire

Juillet 2005

©Alexandre Boyer, 2005



QH

506

U54

2006

V.002

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

**ÉTUDES COMPARATIVES, ÉVOLUTIVES ET RECHERCHE DE GÈNES
IMPORTANTES POUR LA DÉTERMINATION DU SEXE CHEZ LES
MAMMIFÈRES**

Présenté par

Alexandre Boyer

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Éric Milot, président du Jury

David W. Silversides, directeur de recherche

Jacques G. Lussier, co-directeur de recherche

Tim Reudelhuber, membre du jury

David Lohnes, examinateur externe

, représentant du doyen

Thèse acceptée le _____

SOMMAIRE

15 années ont passées depuis la découverte du gène *SRY*, le gène clé pour la détermination des testicules. Depuis cette découverte, de nombreux autres gènes ont été identifiés et démontrent un rôle important pour les processus de la détermination du sexe. Comme pour la plupart des études sur le développement mammalien, la souris est le modèle d'étude le plus couramment utilisé pour étudier ce processus et plusieurs gènes furent identifiés par la fabrication de souris invalidées. Quant aux autres gènes, ils furent identifiés pour la plupart chez des humains démontrant des altérations du phénotype sexuel.

Entre les deux modèles, de nombreuses divergences existent et pour faciliter la compréhension des mécanismes de la détermination et de la différenciation du sexe, nous croyons qu'un lien entre ces deux modèles doit être effectué. L'objectif principal de cette thèse était donc de mettre au point un tel modèle évolutif et comparatif en fabricant des lignées de souris transgéniques exprimant des marqueurs de fluorescence sous le contrôle de promoteurs humains et porcins de gènes importants pour la détermination du sexe selon l'hypothèse que la fonctionnalité des séquences régulatrices devrait être mieux conservée que la séquence elle-même et ce tant pour des gènes fortement conservés lors de l'évolution comme *DMRT1* que des gènes très peu conservés comme *SRY*.

Le contrôle des séquences 5' flanquantes du gène *DMRT1* porcine a été étudié dans un modèle de souris transgéniques. Diverses constructions ont également été effectuées pour étudier les séquences 5' flanquantes des promoteurs humain et porcine de *SRY in vivo*. Tel que prévu dans notre hypothèse, la régulation des séquences 5' flanquantes est fortement conservée durant l'évolution des mammifères.

Un deuxième objectif de cette thèse était de tenter d'identifier de nouveaux gènes importants pour les processus de la détermination et de la différenciation du sexe selon l'hypothèse que comme les cellules pré-Sertoli sont les premières à prendre la voie de différenciation mâle, les gènes clés pour la

détermination du sexe seront exprimés dans ces cellules. Des études d'expression différentielle ont été entreprises en comparant les cellules pré-Sertoli avec les autres types cellulaires des testicules en formation ou en comparant les cellules pré-Sertoli avec les ovaires. Tel que prévu, de nombreux nouveaux gènes comme *Ppt1* et *Brd3* montrent un patron d'expression typique des gènes impliqués dans la détermination ou la différenciation du sexe.

Un dernier objectif était de démontrer un lien entre les cellules de la crête génitale et les cellules de la crête neurale. Pour ce faire, des techniques de culture de coupe de tissus et de transplantation d'organe ont été mises au point. Les résultats de ces études nous permettent de postuler l'hypothèse qu'il y aurait migration d'une sous-population de cellules "précurseurs" des cellules pré-Sertoli de la crête neurale vers la crête génitale. Nous suggérons ici une mise à jour du modèle de la formation d'un testicule en rajoutant cette nouvelle étape à ce modèle.

Toutes ces données nous auront permis une meilleure compréhension des processus de la détermination du sexe et démontrées l'utilité de modèles hétérologues.

Mots clés : Détermination et différenciation du sexe mammalien, souris transgéniques, marqueurs fluorescents, expression différentielle, *DMRT1*, *SRY*, migration, crête neurale, crêtes génitales.

Summary

It is now 15 years since the discovery of *SRY* the key gene for mammalian sex determination and testis formation. Since that time, many additional genes have been identified as having a role in the process of sex determination. As for most studies on mammalian development, the mouse is the model of choice for studying sex determination, and numerous genes were identified in knockout (null allele) mice. Other genes have been identified in human patients with alterations in sex phenotype.

Between these two models, there are some differences. To facilitate our understanding of the mechanisms of mammalian sex determination and differentiation, we believe that a link between these two models, mouse and human, should be made. The principal object of this thesis is to develop an evolutionary and comparative model by generating transgenic mouse lines that express fluorescent marker proteins under the control of human and pig promoters of genes of importance to sex determination. Our initial hypothesis is that the regulation of these promoter sequences would be better conserved than the sequences themselves for genes that are highly conserved during evolution such as *DMRT1* as well as genes that are weakly conserved such as *SRY*.

Pig *DMRT1* 5' flanking sequences were cloned and studied in a heterologous transgenic mouse model. Several constructions were also generated to study the pig and human *SRY* flanking sequences *in vivo*. As predicted by our hypothesis, the regulation of the 5' flanking sequences studied was strongly conserved over evolutionary distances.

A second objective of this thesis was to identify new genes important for the process of determination and differentiation of sex in mammals. Pre-Sertoli cells are thought to be the first cell lines of the genital ridge to commit to the male differentiation pathway, thus the key genes involved in the process of sex determination and differentiation should be expressed in this cell population. Differential expression studies were undertaken to compare pre-Sertoli cells with

other types of cells present within the developing male genital ridge, or with cells of the female genital ridge, at the moment of sex determination. We were able to identify several genes, such as *Ppt1* and *Brd3* that demonstrated a typical pattern of expression for genes involved in male sex determination and differentiation.

A final objective of this thesis was to demonstrate a developmental link between the cells of the genital ridge and cells of the neural crest. To do this, we developed a tissue culture technique and performed organ transplantation studies. The results of these studies permit us to present the hypothesis that there is a migration of a sub-population of precursor pre-Sertoli cells from the neural crest to the genital ridge, which then function to recruit and organize local cells within the male genital ridge. We suggest a revision of the current model for mammalian testicular formation.

This work has led to a further refinement of our understanding of the mechanisms involved in mammalian sex determination, and has also demonstrated the utility of our transgenic mouse models.

Key words: Mammalian sex determination and differentiation, transgenic mice, fluorescent markers, differential expression, *DMRT1*, *SRY*, migration neural crest, genital ridges.

1.2.1	Les crêtes génitales.....	5
1.2.2	Les cellules germinales primordiales.....	6
1.2.3	Les gonades indifférenciées et bipotentielles.....	7
1.2.4	Les testicules.....	7
1.2.4.1	La prolifération des cellules de Sertoli et la formation des cordons testiculaires.....	8
1.2.4.2	La migration des cellules mésonéphriques.....	9
1.2.4.3	La vascularisation.....	10
1.2.4.4	La différenciation des cellules de Leydig.....	10
1.2.5	Les ovaires.....	11
1.2.6	La différenciation des voies génitales internes.....	13
1.3	Découverte et description des gènes impliqués dans le développement des gonades chez les mammifères.....	14
1.3.1	Méthodes d'identification des gènes impliqués dans la formation des gonades chez les mammifères.....	14
1.3.2	Le gène SRY.....	15
1.3.2.1	La recherche du TDF.....	15
1.3.2.2	Expression, structure et rôle potentiel de Sry.....	16
1.3.2.3	Les protéines qui interagissent avec Sry.....	19
1.3.3	La famille des gènes SOXs.....	20
1.3.3.1	Le gène SOX9.....	20
1.3.3.2	Le gène SOX8.....	22
1.3.3.3	Le gène SOX3.....	22
1.3.3.4	Le gène SOX15.....	23
1.3.4	Le gène MIS.....	23
1.3.5	Le gène SF1.....	24
1.3.6	Le gène WT1.....	26
1.3.7	Le gène GATA4.....	28

1.3.8	Le gène DMRT1.....	29
1.3.9	Les gènes LHX9 et LHX1 (LIM1).....	31
1.3.10	Le gène EMX2.....	32
1.3.11	Le gène M33.....	33
1.3.12	Les gènes codant pour les récepteurs à l'insuline.....	33
1.3.13	Le gène FGF9.....	34
1.3.14	Le gène DAX1.....	35
1.3.15	Le gène WNT4.....	37
1.4	Rôle et intégration des gènes dans le mécanisme de détermination et de la différenciation du sexe chez les mammifères.....	39
1.4.1	Dans la formation des gonades bipotentielles.....	39
1.4.2	Lors de la détermination et la différenciation du sexe.....	40
1.4.2.1	Le contrôle de l'expression du gène SRY.....	40
1.4.2.2	Les conséquences de l'expression de SRY.....	42
1.4.2.3	La relation entre SRY et SOX9.....	42
1.4.2.4	La régulation de l'expression du gène MIS.....	44
1.4.2.5	Les nombreux rôles de SF1.....	45
1.4.2.6	La relation entre SF1 et DAX1.....	46
1.4.3	Lors de la différenciation des organes sexuels.....	47
1.4.4	Schéma du processus de la détermination et de la différenciation des testicules chez les mammifères euthériens.....	49
1.5	La complexification des mécanismes de la détermination et de la différenciation du sexe chez les mammifères.....	49
1.6	Objectifs.....	50
CHAPITRE II.....		55

ARTICLE I**Conservation of the function of *DMRT1* regulatory sequences in mammalian sex differentiation.....56**

Abstract.....	57
Introduction.....	58
Material and methods.....	59
Results.....	64
Discussion.....	71
Acknowledgements.....	79
References.....	80

CHAPITRE III.....85**ARTICLE II****Human and pig *SRY* 5' flanking sequences can direct reporter transgene expression to the genital ridge and to neural crest cells.....86**

Abstract.....	87
Introduction.....	88
Material and methods.....	89
Results.....	92
Discussion.....	108
Acknowledgements.....	113
References.....	114

CHAPITRE IV.....120**ARTICLE III****Pre-Sertoli specific gene profiling reveals differential expression of**

Ppt1 and Brd3 genes within the mouse genital ridge at the time of Sex determination.....	121
Abstract.....	122
Introduction.....	123
Material and methods.....	124
Results.....	129
Discussion.....	135
Acknowledgements.....	146
References.....	147

CHAPITRE V

RÉSULTATS ADDITIONNELS ET DISCUSSION.....	153
5.1 Le développement des gonades comme modèle d'organogénèse chez les mammifères.....	154
5.2 Études évolutives de la détermination du sexe.....	154
5.2.1 DMRT1 vs SRY.....	153
5.2.2 Caractérisation des promoteurs de DMRT1 et SRY in vivo.....	155
5.2.2.1 Expression dans les crêtes génitales.....	156
5.2.2.2 Expression dans la crête neurale.....	158
5.3 Lien entre la crête neurale et la crête génitale.....	158
5.3.1 Études de migration.....	159
5.3.2 Transplantation de gonades.....	159
5.3.3 Modèle hypothétique de la formation des testicules.....	160
5.4 Utilisation des souris transgéniques comme outil biologique.....	170
5.4.1 Études d'expression différentielle.....	170

5.4.2 Perspectives.....	174
5.5 Conclusion.....	175
5.6 Contributions à cette thèse.....	176
BIBLIOGRAPHIE.....	177
ANNEXE I.....	xxi
ARTICLE IV	
Rapid genomic identification of transgenic integration sites for mouse	
insertional mutation.....	xxii
Technical report.....	xxiii
Acknowledgements.....	xxviii
References.....	xxix
ANNEXE II	
Protocole de culture de tranches de tissus.....	xxxi

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 3.1 Summary of genital ridge and/or neural crest expression of *SRY* promoter-fluorescent marker transgenic mouse lines.....109
- Tableau 4.1 Identity of cDNA clones found to be differentially expressed by SSH in fluorescent compared to non-fluorescent cells of mouse genital ridge.....136
- Tableau 5.1 Liste des gènes impliqués ou potentiellement impliqués préalablement dans les processus de la détermination et de la différenciation du sexe parmi les 100 gènes les plus exprimés.....173

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Schéma de la détermination et de la différenciation des testicules chez les mammifères euthériens.....	53
Figure 2.1	Schematic comparaison of mouse, human and pig <i>DMRT1</i> 5' flanking sequences.....	66
Figure 2.2	Morphology of developing testis expression of GFP from heterozygous embryos of line pDMRT1p-GFP 11A.....	69
Figure 2.3	Transgene is expressed at low levels in XX embryos.....	70
Figure 2.4	Genotype expression of GFP positive embryonic testis.....	72
Figure 2.5	Morphology of developing gonads expressing YFP in heterozygous double transgenic for pDMRT1p-Cre and R26R-EYFP transgenes, in embryo and adults.....	74
Figure 2.6	Expression of Cre in germ cells.....	75
Figure 3.1	<i>SRY</i> promoter-fluorescent reporter gene transgenes	93
Figure 3.2	Human and pig <i>SRY</i> 5' flanking sequences will support fluorescent marker transgene expression in the genital ridge at e12.5 as well as in newborn and adult testes.....	96
Figure 3.3	Human <i>SRY</i> 5' flanking sequences (5 Kb) support reporter transgene expression within pre-Sertoli cells of the male genital ridge.....	98

- Figure 3.4 Double transgenic marking shows that different *SRY* 5' flanking transgenes will co-mark the pre-Sertoli cell population within the male genital ridge, while this population is distinct from the germ cell population.....100
- Figure 3.5 Comparison of fluorescent marker expression in embryos from human *SRY* promoter fluorescent marker mouse lines hSRYP[5 Kb]-YFP and hSRYP[3.6 Kb]-RFP.....103
- Figure 3.6 Neural crest expression of reporter transgenes in embryos from pig *SRY* promoter fluorescent marker mouse lines..... 105
- Figure 3.7 Comparison of fluorescent marker expression within the abdominal cavity of embryos from pig *SRY* promoter fluorescent marker mouse lines.....107
- Figure 4.1 Abundance of specific cDNA transcripts in subtracted versus non-subtracted cDNA pools of fluorescent (pre-Sertoli) cell cDNAs.....132
- Figure 4.2 Example of differential screening results by macro arrays of the fluorescent subtracted by nonfluorescent (F-NF) cell cDNA library using three different cDNA probes.....134
- Figure 4.3 Examples of different WISH expression patterns observed, using 12.5-dpc genital ridges.....139
- Figure 4.4 Testicular cord WISH expression of *Brd3* and *Ppt1* genes in mouse fetal gonads at different developmental time points.....141

Figure 4.5	Effect of busulfan treatment on WISH expression of <i>Brd3</i> and <i>Ppt1</i> genes (from pre-Sertoli cell expression profiling screen) and of <i>Chk1</i> gene (a germ cell marker) within mouse fetal testes between 12.5 and 13.5 dpc.....	143
Figure 5.1	Étude de migration des cellules de la crête neurale.....	162
Figure 5.2	Étude de transplantation 1.....	164
Figure 5.3	Étude de transplantation 2.....	166
Figure 5.4	Étude de transplantation 3.....	167
Figure 5.5	Nouvel hypothèse du modèle de la formation d'un testicule chez les mammifères euthériens.....	169
Figure 5.6	Identification des 100 gènes démontrant la plus grande surexpression dans les cellules pré-Sertoli par comparaison avec les ovaires lors de de l'étude d'expression différentielle effectuée avec les puces Affymetrix mouse 430_2.....	172
Figure A1.1	Amplification of restriction enzyme mini-genomic libraries.....	xxvi
Figure A1.2	Gene map of the transgene integration site.....	xxvii

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN** : acide désoxyribonucléique
- ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire
- AHC** : Adrenal hypoplasia congenita
- AMH** : Anti-mullerian hormone
- AMHR 2** : Anti-mullerian hormone receptor 2
- ARN** : acide ribonucléique
- ARNm**: acide ribonucléique messenger
- Blast**: Basic Local Alignment Search Tool
- °C** : degré Celsius
- Ca** : Calcium
- CD** : Dysplasie campomélique
- Cyp11A**: Cytochrome P450 family 11 subfamily A
- Cyp19A1**: Cytochrome P450 family 11 subfamily A1
- DAX-1**: DSS-AHC critical region on the X chromosome
- DHH**: Desert Hedgehog
- DMRT1**: Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
- Dpc**: Days post-coitum
- DSS**: Dosage sensitive sex reversal
- Dsx**: doublesex
- e ou E** : embryonnaire
- Ems** : empty spiracle
- Emx2** : empty spiracle mouse homolog 2
- F1, F2, F3** : Génération 1, 2 ou 3 des lignées de souris
- FGF**: Fibroblast growth factor
- FGFr**: Fibroblast growth factor receptor
- FIG- α** : Factor in the germline alpha
- FOG**: Friend of GATA
- FOXL2**: Forkhead box L2
- FST**: Follistatin

GATA: Facteurs de transcription qui lient la séquences d'ADN GATA

GFP: «Green fluorescent protein»

GREAT: G protein-coupled receptor affecting testicular descent

HDAC: Histone déacétylase

HMG: High mobility group

HSP : Heat shock protein 70

HY: Antigène d'histocompatibilité du chromosome Y

Igfl1r: Insulin-like growth factor 1 receptor

InsI3: Insulin-like peptide 3

Ir: Insulin receptor

Irr: Insulin receptor-related receptor

kb: kilobases

K : Knock-out

LacZ: Opéron lactose

LEF-1: Lymphoid enhancer factor 1

LH: Luteinizing hormone

LHX : LIM homeobox domain

LIM : Famille de facteurs de transcription à boîte homéo

M33: Chromobox homolog 2

Mb: mégabase

MIS: Mullerian inhibiting substance

Myc: épitope pour myelocytomatosis oncogene

NLS: Nuclear localisation signal

ORF: Open reading frame

P0,1 2, : Jour après la naissance

PAR : Pseudoautosomal region

PCR: Polymerase chain reaction

pb : paire de bases

PI3K-AKT : Phosphatidylinositol 3-kinase- V-akt murine thymoma viral oncogene

pH: potentiel d'hydrogène

PC4: Positive coactivator 4

PCR: Polymerase chain reaction
PD2: Prostaglandin D2
PDGFR- α : Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
PDZ: PSD-95, Disc large and Zo-1
PGCs: Primordial gonadal germ cells
RARE: Retinoic acid-responsive element
RNase: Ribonucléase
RPA: RNase protection assay
RT: Reverse transcriptase
Sdc: Sex determination and Dosage Compensation
SIP1: SRY interacting protein 1
SF-1: Steroidogenic factor 1
SOX: SRY-related HMG box
SRA1: Sex reversal autosomal locus 1
SRY: Sex-determining region-Y chromosome
SSC: Side chain cleavage
SSH: Suppression subtractive hybridization
Sxl: Sex lethal
Tcf1: T-cell transcription factor 1
TDF: Testis determining factor
TGF: Transforming growth factor
Tra: Transformer
ts: tail somites
WAGR: Wilms tumor-anirida-genitourinary anomalies mental retardation syndrome
WISH: Whole mount *in situ* hybridization
WNT: Wingless-related MMTV integration site
WT1 : «Wilm's tumor gene 1»
Xol-1 : XO lethal protein 1
YFP: Yellow fluorescent protein
ZFX: Zinc finger X gene
ZFY: Zinc Finger Y gene

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche; Dr David W. Silversides qui m'a accueilli dans son laboratoire de recherche alors que j'avais seulement complété un an de baccalauréat et que mes connaissances en biologie moléculaire étaient minimales. Je lui dis donc dans une tournure de phrase moins formelle: «Merci David pour ton dynamisme, ton optimisme et ton enthousiasme qui balançaient mon cynisme et mon pessimisme naturels; le ying à mon yang. Merci pour ce torrent de projets, j'aurais aimé en compléter plus. Finalement, merci de m'avoir laissé toute cette latitude dans le laboratoire et de m'avoir laissé représenter le laboratoire sous le soleil tropical ou septentrional.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de recherche Dr Jacques G. Lussier pour ses judicieux conseils et sa disponibilité à répondre à mes questions et Dr. Andrew H. Sinclair pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à Melbourne, m'avoir déniché des appartements et m'avoir fait sentir comme un véritable membre de son laboratoire.

Un merci tout spécial à Mme Isabelle Daneau pour l'apprentissage de nombreuses techniques de laboratoire durant mes stages, Mme Diana Raiwet sans qui je n'aurais jamais été capable de retrouver mes souris ni de maintenir un horaire de croisement aussi complexe. Merci également à Mme Céline Forget pour l'ensemble des constructions effectuées et Mme Manon Salvat pour toutes ces solutions; vous m'avez rendu paresseux. Merci à Mr Éric Massicotte pour avoir trié semaine après semaine mes cellules pré-Sertoli fluorescentes. Merci à Mmes Micheline Sicotte et Viviane Jodoin pour l'aide administrative.

Je remercie tous les étudiants passés, Dr Saffron Dorman, Mr Ramin Behdjani, Mme Valérie Lévesques, Dr Kalidou di Mamadou Ndiaye, Mme Véronique Paradis; présents, Dr Mame Diouf, Mr Aron Cory et celui qui est revenu, Dr Nicolas Pilon pour avoir enduré mon humour vitriolique. Je tiens à souligner

plus particulièrement Dr Peter J. McClive pour l'apprentissage la technique du WISH et la visite de Melbourne et Mme Tania Fayad pour l'écoute de mes plaintes durant ces cinq années (ou était-ce l'inverse?).

Merci au fonds FCAR et FRSQ pour le support financier au cours de mes études de maîtrise et de doctorat.

Merci à tous mes amis et colocos qui m'ont accompagné dans l'oubli éthylique, surtout Dave et Arnaud.

Merci à Leonard Cohen pour ses disques qui ont bercé la rédaction de cette thèse.

Merci à ma famille d'exister.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1.1 LA REPRODUCTION SEXUÉE ET LA DÉTERMINATION DU SEXE CHEZ LES ANIMAUX

Dans le royaume animal, l'existence de deux sexes est quasi universel d'où la prédominance de la méiose et de la reproduction sexuée. Malgré cela, le mécanisme de la détermination du sexe varie considérablement d'une espèce à un autre.

1.1.1. La détermination sexuelle environnementale

Certaines espèces de reptiles et de poissons n'ont pas de chromosomes sexuels dimorphiques comme chez les mammifères et utilisent plutôt des signaux environnementaux externes pour contrôler leur phénotype sexuel. Le pH, le ratio mâle/femelle de la population et la température joueront un rôle pour déterminer le sexe de la nouvelle progéniture (Haqq et Donahoe, 1998). Chez l'alligator américain, la détermination du sexe sera dépendante de la température à laquelle les œufs auront été incubés. Ainsi les œufs incubés à 32.5-33.0°C deviendront des mâles et les œufs incubés à toute autre température deviendront des femelles (Pieau, 1996). Chez certains poissons, le phénotype sexuel peut être modifié à l'âge adulte par un groupe de stimuli comme les hormones, les signaux visuels ou une indication sociale (Francis et coll., 1993).

1.1.2 La détermination sexuelle chromosomale

1.1.2.1 La détermination sexuelle par ploïdie

Chez les abeilles, le sexe est déterminé par ploïdie. Les embryons diploïdes qui se développent à partir des œufs fertilisés deviendront des femelles alors que les embryons haploïdes qui se développent à partir des œufs non

fertilisés deviendront des mâles. Dans un tel système, les œufs sont produits par méiose par la reine et les spermatozoïdes par mitose chez le mâle ce qui assure que les œufs fertilisés auront un nombre diploïde de chromosomes et les œufs non fertilisés un nombre haploïde de chromosomes (résumé par Charlesworth, 2003).

1.1.2.2 La détermination sexuelle dose-dépendante

Tel que démontré par Bridges en 1921, chez *Drosophila melanogaster*, le sexe est déterminé par le ratio de chromosomes X par rapport aux autosomes. Les mouches normales diploïdes ont une paire de chromosomes sexuels, XX (femelle) ou XY (mâle), et trois paires d'autosomes (AA). Quand le ratio de X:A est de 1 ou plus grand que 1, la mouche sera une femelle tandis qu'un ratio entre 0,5 et 1 produira des mâles. Contrairement aux mammifères, le chromosome Y ne joue pas de rôle lors de la détermination du sexe, ainsi un individu XO sera un mâle quoique stérile et un individu XXY sera une femelle. La cascade des gènes impliqués dans la détermination du sexe va simultanément contrôler le développement des gonades, le phénotype sexuel somatique et l'activation du chromosome X. Chez *Drosophila*, les gènes clefs comme "Sex Lethal" (*Sxl*), "Transformer" (*Tra* et *Tra2*), et "Doublesex" (*Dsx*) sont activés ou non par épissage alternatif (résumé par Lalli et coll., 2003).

Chez *Caenorhabditis elegans*, la détermination du sexe est contrôlée par une cascade complexe impliquant plus d'une dizaine de gènes. Comme chez la mouche, le développement sexuel dépend du ratio X:A. Les nématodes XX deviennent des hermaphrodites et les animaux XO deviennent mâles (Madl et Herman, 1979). Le ratio X:A est converti en signal moléculaire qui contrôle la différenciation sexuelle et le processus de dosage compensatoire (Cline et Meyer, 1996). Le signal sera en premier lieu acheminé par le gène XO lethal protein 1 (*xol-1*), un gène nécessaire pour le développement mâle qui régulera de façon négative les gènes "Sex determination and dosage compensation" (*sdc-1*, *sdc-2* et

sdc-3), tous trois nécessaires pour le développement hermaphrodite (Rhind et coll., 1995).

1.1.2.3 La détermination sexuelle causée par la présence d'un gène dominant

Chez les oiseaux et la plupart des mammifères, la présence d'un gène dominant sera nécessaire pour la détermination du sexe.

Chez les oiseaux, les femelles sont hétérogamétiques (ZW) et les mâles sont homogamétiques (ZZ). Malgré la possibilité qu'il y ait un gène ovarien dominant résidant sur le chromosome W, celui-ci n'a toujours pas été identifié et l'hypothèse qu'une dose double d'un gène situé sur le chromosome Z soit nécessaire pour déclencher la formation des testicules est la plus acceptée actuellement (résumé par Clinton et Haines, 2001).

Chez les mammifères, les mâles sont hétérogamétiques (XY) et les femelles sont homogamétiques (XX). Dès les années 40, les études d'Alfred Jost sur les lapins ont appuyé l'hypothèse de la présence d'un gène dominant sur le chromosome Y et qui serait nécessaire pour la détermination du sexe. La castration *in utero* des gonades de lapin avant leur différenciation provoquait le développement du système reproducteur femelle chez tous les individus. Le développement du canal de Müller était possible alors qu'aucun développement des canaux de Wolff n'était observé (Jost, 1947). Les bases biologiques de l'hypothèse que la voie de développement femelle était une voie de développement par défaut et que les ovaires se développaient seulement en l'absence de l'expression d'un gène dominant sur le chromosome Y étaient déjà présentes. Ce gène dominant tout d'abord hypothétique fut nommé "testis-determining factor" (TDF) puis, lors de son identification, "Sex-determining Region of the Y chromosome" (*SRY*) (Sinclair et coll., 1990).

1.1.3 Les points communs des divers types de détermination du sexe

Malgré les nombreuses divergences entre les modes de détermination du sexe, il semble de plus en plus que des orthologues de mêmes gènes soient impliqués dans ce processus. Ainsi un gène comme "Doublesex and mab related transcript 1" (*DMRT1*) impliqué dans la détermination du sexe chez les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les poissons est apparenté à *Dsx* chez la mouche et à *Mab-3* chez le nématode (Raymond et coll., 1998). Un orthologue de "SRY-related HMG box 9" (*SOX9*), gène également impliqué dans la détermination du sexe chez les mammifères, " SRY-related HMG box 100B" (*SOX100B*) a été récemment identifié chez la mouche et joue également un rôle important dans la détermination du sexe (DeFalco et coll., 2003). Il semble donc que le développement des testicules et des ovaires est remarquablement similaire au niveau génétique à travers les espèces.

1.2 ORIGINE ET DÉVELOPPEMENT DES GONADES CHEZ LES MAMMIFÈRES

1.2.1 Les crêtes génitales

Suite à la gastrulation et aux courbures du disque embryonnaire, les crêtes génitales, ébauches des gonades, apparaissent sous la forme de crêtes longitudinales bilatérales de chaque côté de la ligne médiane et sont juxtaposées aux mésonéphros. Les crêtes génitales sont formées suite à une prolifération de l'épithélium coelomique (Langman et Sadler, 1996). Des cellules somatiques migrant à partir du mésonéphros sont également impliquées dans la formation des crêtes génitales (Martineau et coll., 1997). Chez la souris, les crêtes génitales sont visibles à partir du jour embryonnaire 10 (e10.0) tandis qu'elles sont visibles à

partir de la quatrième semaine de développement chez le fœtus humain. Au jour e10.0, les cellules germinales n'ont toujours pas atteint les crêtes génitales.

1.2.2 Les cellules germinales primordiales

Dès le jour e7.0, il est possible de détecter les cellules germinales primordiales (PGCs) au niveau du mésoderme extraembryonnaire du feuillet amniotique postérieur (Ginsburg et coll., 1990). Elles seront par la suite détectées à la base de la vésicule vitelline où elles formeront un groupe distinct de 75 cellules à l'étape pré-somite (Hogan et coll., 1994). Au jour e8.0, les PGCs entreprendront leur migration active vers les crêtes génitales à partir de l'épithélium de l'intestin postérieur puis en longeant le mésentère dorsal de l'intestin postérieur. Les PGCs envahiront les crêtes génitales aux environs du jour e11.0-e11.5 (Hogan et coll., 1994). Grâce à des divisions toutes les 16 heures, 25 000 PGCs auront colonisé chaque crête génitale au jour e13.0. Le destin des PGCs est par la suite affecté par l'environnement mâle ou femelle des crêtes génitales. Ainsi, dans les crêtes génitales mâles, les PGCs seront séquestrées dans les cordons testiculaires au jour e12.5 puis, au jour e13.5, suite à une interaction avec les cellules de Sertoli, elles seront arrêtées à la phase G1 du cycle cellulaire de la mitose (McLaren et coll., 1988). Dans les crêtes génitales femelles, en l'absence de *SRY*, les PGCs entreront spontanément en méiose (Gubbay et coll., 1992; Hawkins et coll., 1992). Les PGCs ne sont pas nécessaires pour la formation des gonades mâles mais pourraient malgré tout faciliter le processus (McLaren et coll., 1988; Adams et McLaren, 2002). Par contre, les PGCs sont cruciales pour la formation et le maintien des gonades femelles (McLaren, 1984).

1.2.3 Les gonades indifférenciées et bipotentielles

Peu avant et pendant l'arrivée des PGCs dans les crêtes génitales, les cellules de l'épithélium coelomique prolifèrent activement et envahissent le mésenchyme sous-jacent. Chez la souris, au jour e12.0, les cellules épithéliales se multiplient pour former un certain nombre de cordons de formes irrégulières : les cordons sexuels primitifs. Les cordons sexuels primitifs entourent progressivement les PGCs dans le mésenchyme tout en demeurant en contact avec la surface épithéliale. À ce stade, il est toujours impossible de distinguer la gonade mâle de la gonade femelle (Langman et Sadler, 1996). Les gonades possèdent les quatre types cellulaires précurseurs qui serviront à former les testicules ou les ovaires: les PGCs, les cellules de support, les cellules stéréodogéniques et les cellules du tissu conjonctif sont toutes présentes. Les PGCs ont migré et envahi les gonades, les cellules provenant de l'épithélium coelomique se sont différenciées en cellules de support bipotentielles (Karl et Capel, 1998) et les cellules mésenchymateuses se sont différenciées en cellules du tissu conjonctif et en cellules stéréodogéniques (Buehr et coll., 1993; Martineau et coll., 1997). Éventuellement, ces divers types cellulaires se différencieront respectivement en pro-spermatogonies, cellules de Sertoli, cellules endothéliales et myoïdes et cellules de Leydig chez les gonades en développement mâle et en ovocytes, cellules de granulosa, cellules stromales et cellules de la thèque chez les gonades femelles.

1.2.4 Les testicules

Le développement des gonades est initialement identique chez le mâle et la femelle. Cependant, chez les gonades mâles, au jour e10.5 (chez la souris), le gène *Sry* commence à être exprimé. Au jour e11.0, il n'y a toujours pas de différences visibles entre les gonades mâles et femelles; au jour e12.5 les cordons testiculaires sont évidents chez les gonades mâles et au jour e13.5, les testicules sont deux fois plus gros que les ovaires et montrent une complexité

morphologique accrue. Trois événements directement reliés à l'expression de *Sry* et spécifiques aux mâles sont reconnus pour affecter directement les processus précoces de la testiculogénèse : la prolifération cellulaire avec la formation des cordons testiculaires, la migration cellulaire et la vascularisation. La différenciation des cellules de Leydig est par contre moins connue.

1.2.4.1 La prolifération des cellules de Sertoli et la formation des cordons testiculaires

Lors de la formation des testicules, une augmentation de la prolifération des cellules provenant de l'épithélium coelomique se produit entre les jours e11.3 et e12.1 chez la souris (Schmal et coll., 2000). Les cellules provenant de l'épithélium coelomique peuvent adopter deux destins : les précurseurs des cellules de Sertoli et des cellules interstitielles de fonction encore inconnue (Karl et Capel, 1998). Les cellules qui deviendraient les cellules pré-Sertoli ne migreraient pas après le jour e11.5. Cette prolifération serait dépendante de l'expression de *Sry*, d'ailleurs le patron de prolifération des gonades XX de souris transgéniques exprimant *Sry* est identique au patron de prolifération de souris XY sauvage (Schmal et coll., 2000). Inversement, les gonades XY provenant des souris B6XYpos qui deviennent des ovaires ou des ovotesticules démontrent un niveau de prolifération similaire aux gonades XX (Schmal et coll., 2000). De nouvelles études d'expression ont démontré que *Sry* endogène n'est pas exprimé dans les cellules de l'épithélium coelomiques (Bullejos et coll., 2001b) suggérant que les cellules pré-Sertoli exprimant *Sry* à la jonction entre l'épithélium coelomique et le testicule en développement seraient capables d'élargir leur population en recrutant d'une façon non cellulaire et autonome les cellules de l'épithélium coelomique qui n'expriment pas *Sry* en lignée de Sertoli (Tilman et Capel, 2002). Une variante à cette hypothèse est qu'au jour e10.5, des cellules SF1-positives se diviseraient dans l'épithélium coelomique donnant naissance à des cellules filles qui pénétreraient dans la crête génitale; ces dernières exprimeraient à ce moment *Sry* et enverraient un signal à l'épithélium coelomique

d'augmenter la prolifération et de générer plus de cellules pré-Sertoli. Après le jour e11.5, ce processus arrêterait et coïnciderait avec l'arrêt de l'expression de SF-1 par les cellules de l'épithélium coelomique (Lovell-Badge et coll., 2002). Jusqu'à présent, il n'a jamais été démontré que les premières cellules exprimant *Sry* proviennent réellement de l'épithélium coelomique.

1.2.4.2 La migration des cellules mésonéphriques

Les premières preuves qu'il y avait migration de cellules du mésonéphros à la crête génitale sont venues d'expériences où la migration entre ces deux tissus était bloquée en plaçant une membrane entre eux dans des expériences de culture d'organe. Lors de ces expériences, la formation des cordons testiculaires était bloquée (Buehr et coll., 1993). Avec des techniques plus raffinées de culture d'organe, il a été démontré que trois types cellulaires migraient du mésonéphros : les cellules périvitubulaires myoïdes, les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires (Martineau et coll., 1997). La migration se fait dans les gonades XY entre les jours e11.5 et e16.5. À nouveau, *Sry* jouerait un rôle clef dans la migration des cellules. En effet, des expériences ont montré que la migration ne se faisait pas dans les gonades XY de souris n'exprimant pas *Sry* et que la réciproque était vraie, c'est-à-dire que dans les souris transgéniques XX exprimant *Sry*, il y avait migration (Capel et coll., 1999). D'autres expériences ont démontré que la migration des cellules mésonéphriques était capable d'induire la différenciation des cellules de Sertoli en absence de *Sry* chez les précurseurs des cellules de soutien (Tilman et Capel, 1999) ce qui tend à démontrer qu'il y a interaction entre les cellules qui migrent à partir du mésonéphros et les précurseurs des cellules de soutien pour établir la destinée des cellules de Sertoli. Il a été démontré récemment que d'autres phénomènes propres au développement des testicules affectaient la migration des cellules mésonéphriques. Ainsi, la présence de cellules germinales en méiose antagoniserait la migration des cellules et il serait possible de détecter la migration des cellules dans des gonades XX si les cellules germinales sont éliminées (Yao et coll., 2003). De plus, l'hormone

"Mullerian inhibiting substance" (MIS), impliquée dans la régression du canal de Müller, serait également capable d'induire la migration des cellules du mésonéphros aux gonades XX (Ross et coll., 2003).

1.2.4.3 La vascularisation

Le développement de la vascularisation est initialement identique dans les gonades mâles et femelles avant l'action de *Sry* aux environs du jour e11.0. Après ce jour, le mécanisme régissant la vascularisation diffère. Alors que dans les ovaires en développement la mise en place de la vascularisation provient de la prolifération de cellules déjà présentes dans l'organe, dans les testicules en développement la mise en place de la vascularisation nécessite la migration de cellules additionnelles provenant du mésonéphros (Brennan et coll., 2002). Ces cellules endothéliales migratoires vont contribuer à la formation d'une large artère située à la surface du testicule, le vaisseau coelomique. Il a été suggéré que cette artère pourrait être nécessaire pour le transport de la testostérone du testicule au reste de l'embryon afin d'assurer la masculinisation des tissus périphériques chez l'embryons mâles (Brennan et coll., 2002).

1.2.4.4 La différenciation des cellules de Leydig

Peu de choses sont connues sur le développement des cellules de Leydig. La molécule de signalisation "Desert hedgehog" (DHH) qui est produite par les cellules de Sertoli a été impliquée dans le développement des cellules de Leydig (Yao et coll., 2002). En effet, les embryons mutants pour *Dhh* montraient un nombre réduit de cellules de Leydig dans les gonades XY alors que les autres processus du développement testiculaires n'étaient pas affectés. Un autre facteur récemment impliqué dans la formation des cellules de Leydig mais dans une voie parallèle à *Dhh* est la voie de signalisation de "Platelet-derived growth factor receptor alpha" (PDGFR- α) tel que démontré par des études effectuées sur des embryons mutants pour *Pdgfr- α* (Brennan et coll., 2003).

Grâce aux événements décrits préalablement, il y aura développement testiculaire. Les cordons sexuels primitifs se transformeront pour former les cordons testiculaires, constitués de cellules de Sertoli et de cellules germinales, entourés d'une membrane basale de cellules péritubulaires myoïdes (Nordqvist, 1995). Les cordons testiculaires vont ensuite perdre leur connexion avec l'épithélium superficiel et seront séparés de ce dernier par la tunique albuginée (Langman et Sadler, 1996). Les cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins et les cellules de Leydig se retrouvent quant à elles dans l'espace interstitielle. Les testicules en développement, au jour e12.5, peuvent donc être facilement reconnaissables morphologiquement par leur grosseur, la présence de cordons testiculaires et par une forte vascularisation ainsi que biologiquement par la présence de MIS produite par les cellules de Sertoli (Nordqvist, 1995).

1.2.5 Les ovaires

En absence de *Sry*, les gonades bipotentiels prennent la voie de différenciation femelle. La morphologie des ovaires en développement demeure longtemps similaire à celle des gonades indifférenciées et la première indication visuelle qu'il s'agit de gonades femelles n'apparaît qu'au jour e13.5 chez la souris. À ce jour, les cellules germinales commencent à entrer en méiose (Nordqvist, 1995). Dans les ovaires, les cordons sexuels primitifs vont se segmenter en amas cellulaires irréguliers contenant des îlots de cellules germinales; les gonocytes. Ces îlots sont situés dans la région médullaire de l'ovaire et seront remplacés par un stroma vasculaire (Langman et Sadler, 1996). De plus, contrairement aux gonades mâles, l'épithélium superficiel de l'ovaire demeure épais et continue de proliférer afin de donner naissance à une deuxième génération de cordons; les cordons sexuels corticaux. Ces cordons vont pénétrer dans le mésenchyme mais ne s'éloigneront pas de l'épithélium superficiel (Langman et Sadler, 1996). Les cordons corticaux seront à leur tour segmentés en amas cellulaires contenant un ou plusieurs gonocytes qui se transformeront par la

suite en ovogonies alors que les cellules épithéliales qui les entourent formeront les cellules folliculaires (Langman et Sadler, 1996). Peu d'informations biologiques et génétiques existent pour expliquer le développement des ovaires. Les PGCs sont nécessaires pour la différenciation des cellules folliculaires. En absence de ces cellules, les follicules ne peuvent pas se former (Huang et coll., 1993). Les PGS, en absence des cellules de Sertoli, entreront en méiose au jour e13.5 et arrêteront leur développement au stade de la prophase de la méiose I. Elles reprendront leur division au début du cycle ovulatoire (McLaren, 2000). Une autre preuve démontrant l'importance des PGCs en méiose pour la formation des ovaires est qu'avant la méiose, il est possible d'induire la formation de cordons testiculaires dans des gonades XX mais une fois la méiose commencée, les gonades XX perdent leur plasticité et ne permettent plus ces événements (Tillman et Capel, 1999; Yao et coll., 2003). Les cellules germinales méiotiques antagoniseraient certains événements pro-testiculaires. L'entrée en méiose des cellules germinales semble être effectuée dans une vague antéro-postérieure en parallèle avec des marqueurs des cellules somatiques suggérant une influence de ces cellules sur l'entrée en méiose des cellules germinales (Bullejos et Koopman, 2004). Peu de gènes sont exprimés plus fortement dans les ovaires en développement que dans les testicules. "Factor in the germline alpha" (*Figα*), un gène exprimé dans les ovocytes, est nécessaire pour la première étape de la folliculogénèse; le recrutement de cellules de granulosa autour du follicule primordial (Soyal et coll., 2000). Au niveau des cellules somatiques, "Forkhead box L2" *Foxl2* est nécessaire pour la différenciation des cellules de granulosa; dans les souris KO pour *Foxl2* les cellules de granulosa ne peuvent passer de la forme squameuse à cuboïde et il y a arrêt de la folliculogénèse (Schmidt et coll., 2004; Uda et coll., 2004). *Foxl2* n'est par contre pas nécessaire pour la formation des ovaires. Pendant un certain temps, "DSS-AHC critical region on the X chromosome" (*Dax1*) a été considéré comme un facteur menant à la détermination des ovaires mais la fabrication d'une souris KO a démontré que sa présence dans les ovaires n'était pas nécessaire (Yu et coll., 1998a). Un second gène, "Wingless-related MMTV integration site 4" *Wnt4*, inhiberait la migration des cellules

endothéliales et stéroïdogéniques dans les gonades XX ce qui empêcherait la formation du vaisseau coelomique et la production ectopique de stéroïdes (Jeays-Ward et coll., 2003). Un dernier gène, "Follistatin" (*Fst*), serait nécessaire pour empêcher la vascularisation spécifique aux gonades XY et permettre la survie des cellules germinales en méiose dans les gonades XX (Yao et coll., 2004).

1.2.6 La différenciation des voies génitales internes

Tôt dans le développement de l'embryon, tout comme pour la formation des gonades, il est impossible de distinguer les embryons mâles des embryons femelles. En effet, tant les embryons mâles que femelles possèdent l'ébauche des canaux de Müller et des canaux de Wolff.

Chez le mâle, les testicules vont sécréter trois hormones essentielles au développement mâle. Les cellules de Sertoli produiront l'hormone MIS alors que les cellules de Leydig produiront la testostérone et "Insulin like peptide 3" (Insl3). L'hormone MIS est responsable de la régression des canaux de Müller tandis que la testostérone permettra, entre autres, de maintenir en place les canaux de Wolff et de développer les organes génitaux externes mâles (Donahoe et coll., 1987). Un peu plus tard durant le développement embryonnaire, l'hormone Insl3 va permettre la descente des testicules dans le scrotum (Zimmermann et coll., 1999). Le canal de Wolff se différenciera en vésicules séminales, en épидидyme et en canal déférent. De plus, la testostérone permettra le développement des organes génitaux externes comme le pénis et le scrotum (Langman et Sadler, 1996).

Chez la femelle, MIS, Insl3 et la testostérone ne sont pas présents dans les ovaires fœtaux. En absence de MIS, les canaux de Müller sont maintenus. En absence de testostérone, les canaux de Wolff dégénèrent et les organes génitaux externes femelles se développent par défaut. En absence de Insl3, les gonades restent dans l'abdomen. Les facteurs contrôlant la différenciation du canal de Müller sont mal connus. Il a été suggéré que les oestrogènes maternels et

placentaires ainsi que les oestrogènes sécrétés par l'ovaire fœtal pourraient jouer un rôle dans ce processus (Langman et Sadler, 1996). De plus, il a été démontré que la molécule *Wnt4* était nécessaire au développement des canaux de Müller et réprimait la synthèse de testostérone (Vainio et coll., 1999). Les canaux de Müller fusionneront pour former le canal utéro-vaginal dont la différenciation permettra la formation des pavillons de l'oviducte, de l'utérus et de la partie supérieure du vagin. Il y aura également formation des organes génitaux externes comme le clitoris, les grandes lèvres, les petites lèvres et la partie inférieure du vagin (Langman et Sadler, 1996).

1.3 DÉCOUVERTE ET DESCRIPTION DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DES GONADES CHEZ LES MAMMIFÈRES

1.3.1 Méthodes d'identification des gènes impliqués dans la formation des gonades chez les mammifères

La plupart des gènes connus présentement et jouant un rôle dans le processus de la détermination et de la différenciation du sexe ont été identifiés à partir des modèles humains et murins. Les études de patients humains montrant une inversion de sexe ou une dysplasie des gonades ont permis d'identifier des gènes comme *Sry*, *Sox9*, *Dax1* et "Wilm's tumor 1" (*Wt1*) (Sinclair et coll., 1990; Foster et coll., 1994; Guo et coll., 1995; Vilain et coll., 1992). D'autres gènes comme "Chromobox homolog 2" (*M33*), "LIM homeobox domain 9" (*Lhx9*) et "Steroidogenic factor 1" (*Sf1*) ont été identifiés par la présence d'anomalies phénotypiques lors de la détermination du sexe par l'utilisation de souris invalidées pour ces gènes (Kato-Fukui et coll., 1998; Birk et coll., 2000; Luo et coll., 1994). Un gène, *Dmrt1*, a été identifié par la combinaison de l'homologie avec les gènes de *Drosophila* et *C.elegans* (Raymond et coll., 1999a) et la dysplasie des gonades chez des patients humains (Raymond et coll., 1999b). Dernièrement, afin d'identifier plus rapidement et en plus grande quantité des gènes candidats potentiellement impliqués dans le processus de la détermination

du sexe, des études de criblage différentiel comparant les gènes exprimés dans les testicules et les ovaires en développement ont été entrepris par plusieurs laboratoires (Bowles et coll., 2000b; Wertz et Hermann, 2000; Menke et Page, 2002; Smith et coll., 2003b; McClive et coll., 2003; Boyer et coll., 2004).

1.3.2 Le gène *SRY*

1.3.2.1 La recherche du TDF

La description moléculaire du TDF a été rendue possible par l'identification d'individus chez qui le sexe phénotypique était inconsistant avec le sexe chromosomique, des hommes XX et des femmes XY. Quelques hommes XX portaient une courte région du chromosome Y sur l'un des chromosomes X alors que les femmes XY portaient un chromosome Y incomplet. Le TDF se trouvait dans cette région (Page et coll., 1987). Le morceau de chromosome Y correspondait à la région pseudoautosomale du petit bras du chromosome Y, Yp (Page et coll., 1987). Le gène "Zinc Finger Y gene"(*ZFY*) fut d'abord considéré comme candidat potentiel mais diverses études démontrant la présence d'un homologue sur le chromosome X (Schneider-Gadicke et coll., 1989), son expression dans les cellules germinales (Koopman et coll., 1989), sa présence sur un chromosome autosomal chez les marsupiaux (Sinclair et coll., 1988) et l'analyse de quatre nouveaux hommes XX sans le gène *ZFY* dans la région du chromosome Y transloqué (Palmer et coll., 1989), rejetèrent sa candidature. Par une stratégie de clonage positionnel, il a été possible d'identifier un nouveau gène dans cette région : le gène *SRY* (Sinclair et coll., 1990). La présence ou l'absence du gène *SRY* corrélait avec les phénotypes de réversion de sexe. Le gène *Sry* murin fut ensuite cloné (Gubbay et coll., 1990) et par des études sur des souris transgéniques qui portaient dans leur génome un fragment de 14Kb du transgène *Sry*, il fut démontré que chez environ 30% des lignées, les souris XX développaient des testicules ainsi que les autres structures reproductives masculines (Koopman et coll., 1991). Finalement, la génération de souris

transgéniques avec *Sry* invalidé concrétisa que *SRY* était bel et bien le TDF; les souris XY se développant comme des femelles (Lovell-Badge et Robertson, 1990; Gubbay et coll., 1992). S'il est clair que *SRY* est bel et bien le TDF chez la vaste majorité des mammifères euthériens, certains rongeurs possédant de multiples copies de *SRY* et d'autre espèce n'ayant plus de *SRY* (résumé Graves 2001), il en va autrement pour les marsupiaux chez lesquels le rôle de *SRY* comme TDF n'a pu être démontré et pour les monotrèmes chez lesquels *SRY* n'a pas été détecté (Harry et coll., 1995; Graves, 1991; Wakefield et Graves, 2005).

1.3.2.2 Expression, structure et rôle potentiel de *Sry* chez les mammifères euthériens

Chez la souris, l'expression de *Sry* a souvent été comparée à une vague c'est-à-dire que l'expression débute au jour e10.5 (somites caudales (ts) 10-12), atteint rapidement un maximum d'expression au jour e11.5 (ts 18) pour finalement s'éteindre au jour e12.5 (ts 25-28) (Hacker et coll., 1995; Bullejos et Koopman, 2001b; Bergstrom et coll., 2000). Jusqu'à récemment, on croyait que l'expression de *Sry* était limitée aux crêtes génitales mais des transcrits linéaires de *Sry* ont aussi été observés dans le cerveau des embryons de souris (Mayer et coll., 2000). Chez la souris adulte, des transcrits circulaires non traduits sont détectés dans les cellules germinales des testicules (Koopman et coll., 1990, Capel et coll., 1993). Chez les mammifères supérieurs et l'humain, le contrôle de l'expression de *SRY* n'est pas aussi étroit et les transcrits sont retrouvés dans de nombreux tissus fœtaux et adultes (Clépet et coll., 1993). De plus, contrairement à ce qui se passe chez la souris, le gène *SRY* chez l'homme, le porc, le chien et le mouton continue d'être exprimé dans les testicules jusqu'à l'âge adulte (Hanley et coll., 2000; Daneau et coll., 1995; Meyers-Wallen, 2003; Payen et coll., 1996).

La protéine *SRY* possède un domaine conservé de 79 acides aminés nommé boîte "High Mobility Group" (HMG) (Sinclair et coll., 1990). Ce domaine

est caractéristique aux protéines HMG, une famille de facteurs de transcription qui activent ou inhibent la transcription des gènes en liant et en repliant l'ADN (Kamachi et coll., 2000). Plus de 30 mutations causant des inversions de sexe ont été identifiées dans le cadre de lecture ouvert (ORF) du gène *SRY* et toutes ces mutations sauf une se retrouvent localisées à la boîte HMG, confirmant l'importance de cette région (Veitia et coll., 1997a).

Si la boîte HMG est fortement conservée entre les espèces, il en va autrement pour les régions se trouvant à l'extérieur de celles-ci. Certaines régions sont présentes seulement sur la protéine *Sry* de souris. Par exemple, la région riche en glutamine en 3' de la boîte HMG est absente sur la protéine humaine. Cette région permet d'activer l'expression d'un gène rapporteur cible lors d'études réalisées dans des cellules hétérologues alors que la protéine humaine était incapable d'activer ce gène rapporteur (Dubin et Ostrer, 1994). La région riche en glutamine de la protéine *Sry* de souris pourrait jouer un rôle essentiel lors de la détermination du sexe chez la souris; des constructions de *Sry* qui n'ont pas ce domaine étant incapables d'induire la formation des testicules chez les embryons XX de souris transgéniques contrairement à la construction *Sry* de type sauvage (Bowles et coll., 1999). Ces études suggèrent que le mode d'action de *Sry* chez la souris pourrait être différent des autres mammifères. Par contre, d'autres études montrent que lorsqu'on positionne l'ORF de *SRY* humain sous le contrôle du promoteur de *Sry* murin dans des souris transgéniques, une inversion de sexe est possible ce qui tend à réfuter que le mécanisme soit différent entre les souris et les autres mammifères (Lovell-Badge et coll., 2002).

Par analogie aux autres facteurs HMG, *Sry* aurait un rôle de facteur de transcription qui se lie à l'ADN pour modifier l'expression des gènes. Des études de liaison ont été effectuées afin de trouver une séquence consensus sur laquelle pourrait se lier *Sry*. Ces études ont démontré que *Sry* pouvait lier le même site que d'autres protéines à boîte HMG comme "T-cell transcription factor 1" (Tcf-1), "Lymphoid enhancer factor 1" Lef-1 et les membres de la famille Sox. Cette

séquence est constituée de 6 bases avec un nucléotide variable à chaque extrémité A G/T AACAAA T/G T/G; *Sry* préférant un AT à une extrémité et un TT à l'autre (Harley et coll., 1994). Les facteurs à domaine HMG peuvent se lier à l'ADN par des intercalations partielles dans le petit sillon et peuvent également se lier à des jonctions quatre voies et à de l'ADN modifié cisplatine (Ferrari et coll., 1992; Pontiggia et coll., 1994; Trimmer et coll., 1998). Les mutations causant les inversions de sexe affectent l'activité normale de la boîte HMG de la protéine *Sry* en modifiant soit l'affinité de la liaison à l'ADN, soit l'angle du repliement de l'ADN (Pontiggia et coll., 1994).

Aucune cible directe n'a été identifiée pour *Sry* même s'il est largement pensé que *Sry* augmente l'expression de *Sox9* (Harley et coll., 2003). Une autre hypothèse indirecte montrant un lien entre *Sry* et *Sox9*, est une série d'expériences impliquant des souris transgéniques exprimant des protéines SRY marqués avec un épitope Myc. Ces expériences ont démontré que l'ensemble des cellules exprimant cet épitope deviennent rapidement doublement positives pour l'épitope et *Sox9* avant de devenir simplement positives pour *Sox9* (Sekido et coll., 2004). Une autre voie de signalisation dont l'expression est fortement augmentée après l'expression de *Sry* dans les gonades mâles et les gonades mâles d'embryons XX exprimant *Sry*, est la voie "Phosphatidylinositol 3-kinase-V-akt murine thymoma viral oncogene" (PI3K-AKT) menant à la formation de glycogène mais encore là, un lien direct n'a pas été démontré (Matoba et coll., 2005). De nouveaux modèles proposent que *Sry* pourrait se fixer à l'ARN et jouer un rôle dans l'épissage des pré-ARNm plutôt que de se fixer à l'ADN (Ohe et coll., 2002). Il a été démontré que *Sry* et *Sox6* se retrouvaient dans les compartiments des facteurs d'épissage dans le noyau (Mistelli, 2002) et qu'elles étaient capables de lier l'ARN (Lalli et coll., 2003). Finalement, des similarités entre le domaine HMG de *Sry* et le domaine de liaison à l'ARN du petit antigène de l'hépatite delta ont été identifiées (Veretnik et Gribskov, 1999).

1.3.2.3 Les protéines qui interagissent avec Sry

Comme la plupart des facteurs de transcription fonctionnent en complexes, des recherches ont débuté afin d'identifier des protéines qui interagissent avec Sry (et Sox9). Ces recherches ont permis d'identifier deux types de protéines; celles nécessaires pour le transport nucléaire et celles qui agiraient comme cofacteur de transcription.

Sry interagit avec des protéines nécessaires pour le transport nucléaire. Ces protéines reconnaissent des signaux consensus de localisation nucléaire (NLS) localisé à la fin du domaine HMG (Preiss et coll., 2001). Les protéines possédant ce signal consensus sont transportées dans le noyau par les importines (Jans et coll., 2000). Il a été démontré par la suite que le domaine NLS en C-terminal du domaine HMG était fortement reconnu par l'importine β . Par contre, le domaine NLS en N-terminal lierait plutôt la calmodulin; également impliqué dans l'importation de molécules au noyau, de manière dépendante du Ca^{2+} (Harley et coll., 1996). Il serait donc possible que les défauts dans la détermination du sexe chez les individus démontrant une inversion du sexe proviennent d'une mauvaise localisation cellulaire de protéines comme Sry (ou Sox9). En effet, des études *in vivo* ont démontré une interaction réduite entre le domaine NLS de SRY et la calmodulin par la présence de l'antagoniste de la calmodulin calmidazolium; la localisation de SRY au noyau était empêchée (Sim et coll., 2005). La protéine SRY humaine pourraient également interagir avec l'histone acétyltransferase p300 ce qui permettrait l'acétylation de SRY sur un résidu lysine. Cet acétylation favoriserait l'interaction avec l'importine β et la localisation au noyau de SRY alors que la déacétylation avec HDAC3 favoriserait la délocalisation de SRY vers le cytoplasme (Thevenet et coll., 2004).

Des cofacteurs transcriptionnels potentiels pour la protéine SRY humaine ont également été identifiés. Initialement, "SRY interacting protein 1" (SIP1) a été isolée suite à un criblage deux-hybrides de levure (Poulat et coll., 1997). Cette

protéine contient deux domaines "PSD-95, disc large and Zo-1" (PDZ) qui pourraient médier une interaction entre SIP1 et SRY. L'interaction SIP1-SRY favoriserait un ordre plus complexe de nucléoprotéines ce qui pourrait expliquer pourquoi SRY ne fonctionne pas dans les essais de gènes rapporteurs. Par contre, le domaine de SRY auquel pourrait se lier SIP1 n'est pas présent chez la souris et cette interaction pourrait être spécifique à l'espèce. Un autre possible coactivateur est "Positive Cofactor 4" (PC4). PC4 interagit avec plusieurs membres de la machinerie transcriptionnelle de base activateurs transcriptionnels suggérant qu'il pourrait agir comme adaptateur entre ces deux éléments (Malik et coll., 1998). Ainsi PC4 pourrait faire la jonction entre SRY et la machinerie transcriptionnelle.

1.3.3 La famille des gènes *SOXs*

Les gènes de la famille SOX sont des régulateurs du développement caractérisés par la présence d'un domaine HMG; un domaine de liaison à l'ADN ayant 50% d'homologie ou plus avec le domaine HMG de SRY. Au moins 30 gènes de cette famille ont été identifiés (Osaki et coll., 1999) et sont divisés en 12 familles définies par une homologie à l'extérieur du domaine HMG (Bowles et coll., 2000). Au moins quatre membres de la famille SOX sont exprimés dans les gonades en développement : SOX9, SOX8, SOX3 et SOX15.

1.3.3.1 Le gène *SOX9*

Le gène *SOX9* fait partie du sous-groupe E avec, entre autres, le gène *SOX8*. Une mutation hétérozygote de *SOX9* cause la dysplasie campomélique (CD) chez l'humain, un syndrome caractérisé par un développement anormal des os, la mort périnatale et d'autres anomalies (Bricarelli et coll., 1981). Environ 75% des individus XY hétérozygotes pour *SOX9* montrent également des défauts dans la formation des testicules ou une inversion de sexe complète. De plus, une duplication chromosomale contenant le locus pour *SOX9* a été trouvée chez un individu XX démontrant une inversion de sexe femme à homme fournissant de

nouvelles preuves de l'implication de *SOX9* dans le processus de détermination du sexe (Huang et coll., 1999). La CD est habituellement causée par des mutations qui affectent la liaison à l'ADN ou le domaine d'activation de la transcription de *SOX9*. De plus, des translocations et des inversions situées à plusieurs centaines de kilobases en amont de *SOX9* ont été identifiées (Wagner et coll., 1994; Wirth et coll., 1996) ce qui démontre la complexité des séquences régulatrices de ce gène. Ces expériences ont été corroborées par des analyses transgéniques des séquences promotrices de *Sox9* (Bishop et coll., 2000a; Wunderle et coll., 1998). Des études *in vivo* et *in vitro* ont aussi démontré que *SOX9* peut se lier et replier l'ADN et agir comme un activateur transcriptionnel (Bell et coll., 1997; Lefebvre et coll., 1997). Plus récemment, il a été suggéré que *SOX9* pourrait avoir un rôle durant l'épissage des pré-ARNm (Ohe et coll., 2002).

Au cours de la détermination du sexe, il a été démontré que *Sox9* peut contrôler le promoteur de *MIS* par des études de co-transfection (De Santa Barbara et coll., 1998) et par des études de mutations sur le site de liaison de *Sox9* sur le promoteur de *MIS* (Arango et coll., 1999). D'autres études *in vitro* démontrent un rôle pour *Sox9* dans l'augmentation de l'expression de *Sfl* chez le mâle (Shen et Ingraham, 2002). Finalement, trois modèles de souris confirment à nouveau le rôle de *Sox9* dans le processus de la détermination du sexe. Tout d'abord, le gène *Sox9* a été placé sous le contrôle des séquences régulatrices de *Wtl* et la présence de ce transgène était suffisante pour induire la formation des testicules dans les souris XX (Vidal et coll., 2001). Ensuite, en utilisant une approche de ciblage conditionnel, il a été démontré qu'une délétion homozygote de *Sox9* dans les gonades XY interfère avec la formation des cordons testiculaires et l'activation de marqueurs spécifiques aux mâles comme *Mis* et *P450scc* et mène à l'activation de marqueurs femelles comme *Follistatin* (Chaboissier et coll., 2004). Finalement, chez la souris Odd Sex dont les individus XX se développent comme des mâles à cause de l'expression de *Sox9* chez les femelles, une mutation dans le gène *Sry* a été introduit afin de démontrer que *Sox9* était

suffisant pour récapituler toutes les étapes du développement mâle en l'absence de *Sry* dans cette lignée de souris (Qin et Bishop, 2005).

1.3.3.2 Le gène *SOX8*

Le gène *Sox8* se rapproche énormément d'un point de vue structural de *Sox9* particulièrement dans le domaine HMG et dans le domaine de transactivation C-terminal (Schepers et coll., 2003). De plus, *Sox8* montre un patron d'expression dans les cellules de Sertoli qui se superpose à celui de *Sox9* dans les testicules en développement. Des études *in vitro* récentes ont démontré que *Sox8* pouvait également activer le promoteur de *Mis*, mais avec une moins grande activité que *Sox9* (Schepers et coll., 2003). Par contre, des souris invalidées pour *Sox8* n'ont pas démontré de changements phénotypiques des gonades suggérant une redondance de fonction avec *Sox9* (Sock et coll., 2001). Finalement, des études de double invalidation de *Sox8* et *Sox9* par ciblage conditionnel au niveau des testicules a démontré que *Sox8* renforçait le rôle de *Sox9* dans la différenciation du sexe (Chaboissier et coll., 2004).

1.3.3.3 Le gène *SOX3*

Sox3 est un gène d'un seul exon situé sur le chromosome X. Il représente le gène de la famille Sox qui montre le plus d'homologie de sa boîte HMG avec *Sry*. Ceci a suggéré l'hypothèse que *Sox3* était le précurseur évolutif de *Sry* (Stevanovic et coll., 1993; Foster et Graves, 1994). Des analyses de mutations chez des patients XX mâles inexplicables n'ont par contre pas permis d'impliquer *SOX3* dans le processus de la détermination et de la différenciation des testicules (Lim et coll., 2000).

Des études d'expression réalisées par protection à la RNase chez la souris ont permis de détecter la présence de *Sox3* dans les crêtes génitales des deux sexes au jour e11.5 (Collignon et coll., 1996). De plus, des souris invalidées

conditionnellement ont été fabriquées et démontrèrent de nombreuses anomalies comme : un mauvais alignement des dents, un excès d'atréisie folliculaire et l'ovulation d'ovocytes défectueux chez la femelle ainsi qu'une réduction de la taille des testicules, une vacuolisation excessive des cellules de Sertoli, la perte de cellules germinales et une malformation du tubule séminifère chez les mâles (Weiss et coll., 2003). *Sox3* ne serait pas requis pour la détermination des gonades, mais serait important pour le développement normal des ovocytes, la différenciation des testicules et la gamétogénèse.

1.3.3.4 Le gène *SOX15*

Peu de notions sont connues sur *Sox15*, mais il a été démontré par des études de Northern blot que l'expression de *SOX15* humain était limitée aux testicules fœtaux (Hiraoka et coll., 1998). L'expression de *Sox15* pendant l'embryogenèse de la souris a été étudiée plus en détail. Il a été démontré que *Sox15* était exprimé dans les gonades du jour e11.5 à e13.5 avec un sommet d'expression au jour e12.5. Le taux d'expression était environ deux fois plus élevé dans les gonades mâles que dans les gonades femelles (Sarraj et coll., 2003). Ces données suggèrent un rôle pour *Sox15* lors de la détermination du sexe. Les souris invalidées pour *Sox15* ont montré un changement phénotypique de la formation des myocytes, mais sont fertiles et aucun changement dans le développement des gonades n'a été observé (Lee et coll., 2004).

1.3.4 Le gène *MIS*

La MIS ou "Anti-Müllerian Hormone" (AMH) est un facteur clef dans la différenciation du sexe chez les mâles. Au début du développement des gonades, *Mis* est exprimé de façon dimorphique et se retrouve seulement chez le mâle à partir du jour e13.0 dans les cellules de Sertoli (Munsterberg et Lovell-Badge, 1991). Ce membre de la famille des TGF- β est sécrété par les cellules pré-Sertoli des gonades embryonnaires XY (Blanchard et Josso, 1974; Donahoe et coll.,

1977; Munsterberg et Lovell-Badge, 1991) et induit la régression du canal de Müller qui se différencierait en oviducte, utérus et partie supérieure du vagin. L'analyse phénotypique de souris déficientes en *Mis* fonctionnel confirme la nécessité de cet hormone pour la régression du canal de Müller et démontre également un rôle dans la régulation de la prolifération des cellules de Leydig dans les testicules adultes (Behringer et coll., 1994). La régulation spatiale et temporelle de *Mis* est importante pour ses actions biologiques (Arango et coll., 1999) et nécessite de nombreux gènes comme *Sfl*, *Wtl*, *Dax1*, *Gata4*, *Sox9* et *Sox8*.

Jusqu'à tout récemment, aucun rôle pour MIS n'avait été identifié dans le développement précoce des testicules, mais quelques évidences pouvaient laisser croire le contraire. En effet, chez les oiseaux et les alligators, l'expression de *MIS* précède l'expression de *SOX9* (résumé: Morrish et Sinclair, 2002). De plus, les études du Freemartinisme ont montré que les embryons bovins femelles perdaient leurs cellules germinales dans les ovaires et dans quelques cas développaient des tubules séminifères (Jost et coll., 1947). Dans ces embryons, la concentration de MIS dans le sérum était aussi élevée dans l'embryon femelle que mâle (Vigier et coll., 1984). Il a donc été démontré par des expériences de co-culture de gonades et de mésonéphros embryonnaire que *Mis* était capable d'induire la migration des cellules mésonéphriques dans les gonades XX et pourrait jouer un rôle dans ce processus dans les gonades XY (Ross et coll., 2003).

1.3.5 Le gène *SF1*

Le gène *SF1* code pour un facteur de transcription membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins hormonaux. Cette famille de récepteur ne possèdent pas de ligand défini et peuvent participer à l'activation transcriptionnelle à l'aide de différents ligands comme les hormones stéroïdiennes, les hormones thyroïdiennes, la vitamine D, les rétinoïdes et les acides biliaires.

À l'origine, *Sf1* a été identifié comme un régulateur clef de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Ikeda et coll., 1994; Morohashi et coll., 1994). Des études supplémentaires démontrèrent que *Sf1* contrôlait de nombreux gènes tout le long de l'axe endocrine hypothalamus-hypophyse-surrénales-gonades (Ikeda et coll., 1995; Ingraham et coll., 1994; Parker et Schimmer, 1997). L'importance de *Sf1* dans le système endocrine est soulignée par le fait que *Sf1* est exprimé tant dans les cellules stéroïdogéniques que non-stéroïdogéniques incluant les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli. Pendant les étapes précoces du développement des organes endocrines, la perte de *Sf1* compromet le développement de la surrénale antérieure (Zhao et coll., 2001) ce qui entraîne à l'absence de glandes surrénales et de gonades dans les deux sexes (Luo et coll., 1994). Les gonades des embryons des souris invalidées cessent de se développer entre les jours e11.0-11.5 et dégèrent via un processus d'apoptose. La déficience en testostérone et en Mis qui découle de l'absence de testicules cause chez les souris XY invalidées une inversion de sexe mâle à femelle au niveau des appareils génitaux externes et internes. Des souris invalidées conditionnellement pour *Sf1*, basées sur l'expression de Cre sous le contrôle du promoteur de "Anti-Müllerian hormone receptor 2" (*Amhr2*), dans les cellules de Leydig ont démontré une fois de plus le rôle joué par *Sf1* dans la survie des cellules de Leydig et dans la production de la testostérone (Jeyasuria et coll., 2004). Un cas d'inversion complète de sexe chez l'humain a été observé suite à une mutation dans le gène *SF1*. Ce patient possède un allèle normal du gène et un allèle contenant deux mutations non-sens qui abolissent la liaison de SF1 à l'ADN. Chez cet individu, les gonades sont présentes mais malformées (Achermann et coll., 1999). Trois autres patients possédant une mutation dans le gène *Sf1* et ayant divers degrés d'anormalité sexuelle ont été identifiés (Achermann et coll., 2002; Bland et coll., 2000; Correa et coll., 2004).

Sf1 est un des premiers marqueurs à définir les glandes surrénales et les gonades primordiales. Il est exprimé dans les crêtes urogénitales à un faible taux

avant même la différenciation du sexe et ce tant chez les mâles que les femelles (Ikeda et coll., 1994). Dans les gonades mâles, l'expression de *Sfl* continue dans les précurseurs des cellules de Leydig et de Sertoli jusqu'au jour e12.5. L'expression va, par la suite, être restreinte aux cellules de Leydig. Dans les gonades femelles, l'expression de *Sfl* cessera au jour e13.0 (Ikeda et coll., 1996). L'expression de *Sfl* chez le mâle est très importante compte tenu que *Sfl* est impliqué dans le contrôle de la testostérone, de *Mis* et de *Insl3*, les trois hormones nécessaires au développement phénotypique mâle (Parker, 1998; Roberts et coll., 1999; Zimmermann et coll., 1998; Zimmermann et coll., 1999).

1.3.6 Le gène *WT1*

Le gène *Wt1* code pour un facteur de transcription à doigt de zinc qui est inactivé dans plusieurs tumeurs de Wilm. Les analyses de mutations chez les patients humains et les expériences chez les souris ont démontré que *Wt1* pouvait avoir des rôles dans de nombreuses fonctions dont la suppression de tumeurs, le développement embryonnaire et les fonctions corporelles normales comme le démontre son implication dans de nombreuses maladies comme: le syndrome de Denys-Drash (Pelletier et coll., 1991a,b; Patek et coll., 1999), le syndrome de Frasier (Barboux et coll., 1997; Klamt et coll., 1998), le syndrome "Wilms tumor-anirida-genitourinary anomalies mental retardation syndrome" (WAGR) (Gessler et coll., 1993) ainsi que dans des leucémies malignes (Inoue et coll., 1994; Tamaki et coll., 1999), des cancers du sein (Silberstein et coll., 1997) et des poumons (Oji et coll., 2002).

WT1 fut isolé chez l'humain par clonage positionnel en relation avec le locus de la tumeur de Wilm, un cancer du rein (Call et coll., 1990). Son homologue chez la souris fut cloné par criblage d'une librairie d'ADNc du rein fœtal (Buckler et coll., 1991). *Wt1* s'avère un gène extrêmement complexe au niveau moléculaire puisque des modifications post-transcriptionnelles de l'ARN pré-messager de *Wt1* mènent à la production de 24 isoformes différentes (Reddy

et Licht, 1996; Sharma et coll., 1994) qui peuvent jouer des rôles développementaux et fonctionnels tant différents que redondants. Ces isoformes diffèrent par certaines préférences de liaisons à l'ADN et par leur localisation au noyau (Larsson et coll., 1995; Lodomery et coll., 1999; Englert et coll., 1995).

Dans les gonades, *Wtl* est exprimé, dans les gonades indifférenciées, dans les cellules somatiques (Racley et coll., 1993). La première évidence que *WT1* pouvait jouer un rôle dans le développement est venue de l'étude de mutations ponctuelles au niveau de *WT1* qui entraînaient des malformations urogénitales (Baird et coll., 1992; Pelletier et coll., 1991a, 1991b). Les souris invalidées pour *Wtl* mouraient *in utero* et démontraient énormément de problèmes développementaux dont l'absence de reins et de gonades et un phénotype femelle (Kreidberg et coll., 1993). Le rôle de *Wtl* s'est, depuis ce temps, complexifié. Des souris invalidées ont été fabriquées pour les isoformes WT1(-KTS) et WT1(+KTS) (pour la présence ou non des acides aminés Lys-Thr-Ser entre le troisième et le quatrième doigt de zinc). Les souris invalidées pour les deux isoformes survivent jusqu'à la naissance mais leur phénotype diffère (Hammes et coll., 2001). Les souris manquant l'isoforme (-KTS) montrent de plus petits reins et gonades avec plus d'apoptose dans les gonades, alors que les souris n'ayant pas l'isoforme (+KTS) avaient un problème de différenciation des podocytes dans le rein et les gonades se développaient comme des ovaires tant chez les mâles que chez les femelles. Les souris mutantes pour (-KTS) montraient toujours de l'expression de *Sox9* quoique limitée à un petit nombre de cellules alors que les souris mutantes pour (+KTS) n'avaient aucune expression de *Sox9* ou de *Mis*. Le manque d'expression de gènes spécifiques aux mâles est causé par une réduction de 25% de l'expression de *Sry* ce qui est suffisant pour empêcher la formation des testicules (Hammes et coll., 2001). Pour l'instant, il n'est pas clair comment l'isoforme (+KTS) agit sur *Sry* surtout que *in vitro* seul l'isoforme (-KTS) active la transcription de *Sry* (Hossain et Saunders, 2001).

Wtl est un gène central dans la détermination du sexe. Il a été démontré par de nombreuses études *in vitro* que son expression est activée par *Sry* (Toyooka et coll., 1998) et qu'il contribue à activer *Sfl*, *Dax1*, *Sry* et *Mis* (Wilhem et Englert, 2002; Hossain et Saunders, 2003; Kim et coll., 1999, Matsuzawa-Watanabe et coll., 2003). *Wtl* entre également en compétition avec *Dax1* pour modifier l'activité de *Sfl* (Nachtigal et coll., 1998). Dernièrement, le processus d'acétylation/désacétylation a également été impliqué dans le contrôle de *Wtl*; l'histone acétyltransférase p300 activant le promoteur *WT1* humain ainsi que l'activateur intronique (Shao et coll., 2005).

1.3.7 Le gène *GATA4*

La famille des facteurs liant la séquence GATA (facteurs GATA) est un groupe de régulateurs transcriptionnels conservés pendant l'évolution et qui lient le motif WGATAR. Présentement, six facteurs GATA sont connus chez les vertébrés (*GATA1* à *6*) qui partage un motif à doigt de zinc (Molkentin, 2000; Scazzocchio, 2000; Weiss et Orkin, 1995). Les facteurs GATA jouent des rôles dans plusieurs processus développementaux comme la différenciation des cellules hématopoïétiques et des cellules T, le développement de la vascularisation cardiaque et coronarienne et la morphogénèse du foie, des poumons et de l'estomac (Patient et McGhee, 2002; Orkin, 2000; Molkentin, 2000; Rossi et coll., 2001; Jacobsen et coll., 2002; Yang et coll., 2002). Les souris déficientes en *Gata4* meurent à un stade embryonnaire précoce à cause de défauts dans la formation du cœur et la morphogénèse ventrale (Kuo et coll., 1997; Molkentin et coll., 1997).

Un rôle dans la détermination du sexe a été suggéré pour *Gata4* lorsqu'il fut démontré que *Gata4* avait un patron d'expression dimorphique dans les gonades en formation. Au jour e11.5, *Gata4* est exprimé dans les crêtes génitales des deux sexes (Heikinheimo et coll., 1997; Viger et coll., 1998). Au jour e13.5, *Gata4* est exprimé seulement dans les testicules en développement et son

expression augmente dans les cellules de Sertoli et diminue dans les cellules interstitielles. L'expression de *Gata4* persiste dans les cellules de Sertoli après la naissance alors que son expression est réactivée dans les cellules de granulosa adultes (Viger et coll., 1998). Il a été démontré que *Gata4* pouvait se lier sur le promoteur de *Mis* et transactiver ce dernier *in vitro* (Viger et coll., 1998; Tremblay et Viger, 1999). Toujours par des études *in vitro* de retard sur gel, d'empreintes à l'ADN et de transfection, il a été démontré que *Gata4* était important pour l'expression robuste de *Dmrt1* dans les testicules (Lei et Heickert, 2004). Comme les souris déficientes en *Gata4* meurent entre les jours e7-9.5, le rôle de *Gata4* dans la différenciation des gonades n'a pas encore été démontré directement. Par contre, un rôle pour *Gata4* a été montré indirectement par l'étude de souris invalidées pour *Fog2* (Tevosian et coll., 2002). Les protéines de la famille FOG ne peuvent lier l'ADN seul et agissent comme activateurs ou répresseurs de l'activité de GATA (Holmes et coll., 1999). *Fog2* est exprimé dans les gonades en formation au même moment et dans les mêmes cellules que *Gata4* (Tevosian et coll., 1999). Les souris invalidées pour *Fog2* meurent au jour e14.5 et l'étude du développement précoce des gonades est possible. Dans ces souris, l'expression de *Sry* est dramatiquement réduite au jour e11.5. De plus, de nombreux gènes cruciaux pour le bon fonctionnement des cellules de Sertoli comme *Sox9*, *Mis* et *Dhh* ne sont pas exprimés dans les gonades XY alors que *Wnt4*, un marqueur du développement des ovaires l'est (Tevosian et coll., 2002). Des résultats similaires sont observés chez les souris portant une mutation pour *Gata4* qui empêche sa liaison à *Fog2* (Tevosian et coll., 2002). Par similarité avec l'interaction entre *Gata4* et *Fog2* au niveau des myocytes cardiaques, le coactivateur p300 pourrait être impliqué dans le rôle de *Gata4* lors de la détermination du sexe (Hirai et coll., 2004).

1.3.8 Le gène *DMRT1*

En général, les gènes clefs de la détermination et la différenciation du sexe sont peu conservés entre les divers genres animaux. Une des rares exceptions sont

les gènes possédant un domaine DM, un domaine de liaison doigt de zinc, comme les gènes *dsx* (*Drosophila* doublesex) (Baker et Ridges, 1980) et *mab3* chez *C.elegans* (Shen et Hodgkin, 1998).

Le gène *DMRT1* a été le premier gène possédant un domaine DM cloné chez l'humain et la souris (Raymond et coll., 1998; 1999b). Chez l'humain, *DMRT1* est situé sur le bras court du chromosome 9 et plus précisément sur le locus automal 9p24.3 (Guioli et coll., 1998). Ce locus est associé, lorsque hémizygote, à un défaut du développement testiculaire et une féminisation XY (résumé par Ottolenghi et McElreavey, 2000). Deux autres gènes possédant un domaine DM, *DMRT2* et *DMRT3* (Raymond et coll., 1999a) se retrouvent également dans cette région.

Chez la souris, *Dmrt1* est exprimé dans la crête génitale des deux sexes à la même intensité entre les jours e10.5 et e13.5 lors du développement des gonades. Entre les jours e14.5 et e15.5, l'expression de *Dmrt1* diminue dans les ovaires et est augmentée dans les testicules. Dans les testicules en développement, *Dmrt1* est exprimé dans les cellules de Sertoli et dans les cellules germinales (Raymond et coll., 1999a). La fabrication de souris invalidées pour *Dmrt1* a montré qu'il n'était pas essentiel pour la détermination du sexe mais l'était pour la différenciation postnatal des testicules, notamment lors de la spermatogénèse. Les défauts morphologiques observés chez les souris invalidées rappellent ceux rapportés pour les humains hémizygotes pour le locus 9p24.3. *Dmrt1* n'est pas nécessaire pour le développement des ovaires et les femelles sont complètement fertiles (Raymond et coll., 2000). Le mode d'action de *Dmrt1* demeure par contre inconnu puisque contrairement aux gènes possédant un domaine DM comme *dsx* et *mab-3* pour lesquels un site de liaison à l'ADN est connu, aucun site de reconnaissance n'a encore été identifié pour *Dmrt1*.

Dernièrement, il a été démontré que les mammifères possédaient au moins sept gènes ayant un domaine DM. Parmi ces sept gènes, trois d'entre eux sont

exprimés dans les gonades en développement chez la souris. *Dmrt4* est exprimé aussi fortement dans les testicules et les ovaires, *Dmrt3* est exprimé plus fortement dans les testicules et *Dmrt7* est exprimé plus fortement dans les ovaires en développement (Kim et coll., 2003). Le rôle des gènes de la famille DM dans le développement sexuel des mammifères pourrait donc être éventuellement élargi.

1.3.9. Les gènes *LHX9* et *LHX1 (LIM1)*

Les facteurs de transcription LHX font partie d'une grande famille de facteurs de transcription que l'on retrouve à la fois chez les vertébrés et les invertébrés (Hobert et Westphal, 2000). Les membres de cette famille, comme les autres gènes possédant une boîte homéo, sont d'importants régulateurs du développement (Hobert et Westphal, 2000).

Lhx9 est exprimé, dans les crêtes urogénitales en développement, à partir du jour e9.5 chez le mâle. Au jour e11.5 *Lhx9* est fortement exprimé dans l'épithélium germinal et le mésenchyme sous-jacent alors qu'au jour e13.5 son expression est dans la tunique albuginée en développement, plus faible dans le mésenchyme interstitiel et presque absente dans les cordons testiculaires. Chez la femelle, l'expression ressemble à celle du mâle du jour e9.5 à 11.5 puis au jour e13.5 l'expression était limitée à la région corticale des ovaires en développement (Birk et coll., 2000). Des souris invalidées pour *Lhx9* n'ont pas de gonades et montrent une inversion phénotypique du sexe de mâle à femelle. Les souris *Lhx9* sont infertiles dû à l'absence de gonades et possèdent un utérus, un vagin et des oviductes atrophiés. Elles n'ont aucun organe sexuel accessoire ni de cycle oestral et elles ont concentrations élevées de FSH et des concentrations non détectables de testostérone. Chez les souris invalidées, l'expression de *Sfl* est fortement réduite ce qui indique que *Lhx9* pourrait se retrouver en amont de *Sfl* dans la cascade de développement (Birk et coll., 2000).

Initialement, un rôle avait été suggéré pour *Lhx1* dans les premières étapes du développement des gonades indifférenciées car les souris invalidées pour *Lhx1* ne possédaient pas de gonades, de rein et de cerveau) (Shawlot et Behringer, 1995). Aucune expression de *Lhx1* dans les gonades n'a été rapportée et il semblerait que l'absence de gonades provenait d'une mauvaise dissection. Par contre, de nouvelles études sur des souris invalidées, à partir de lignées de souris ayant un bagage génétique différent, démontrèrent que ces souris pouvaient vivre légèrement plus longtemps tandis que les embryons femelles montraient des défauts dans les tissus dérivés du canal de Müller (Kobayashi et coll., 2004). Finalement, l'utilisation de souris exprimant LacZ sous le contrôle du promoteur de *Lhx1*, montre l'expression de ce transgène au niveau du canal de Wolff et du canal de Müller (Kobayashi et coll., 2004).

1.3.10 Le gène *EMX2*

Le gène "Empty spiracle 2" (*Emx2*) est l'homologue du gène *ems* (empty spiracles) chez *Drosophila*; un gène essentiel pour le développement du télencéphale (Yoshida et coll., 1997). Chez la souris, *Emx2* est exprimé dans les composants épithéliaux du système urogénital y compris dans les gonades en développement. Les souris invalidées pour *Emx2* n'ont pas de reins, d'uretères et de gonades tant chez les mâles que les femelles. Les canaux déférents, l'épididyme et les vésicules séminales sont également absents chez le mâle alors que les oviductes, l'utérus et la partie supérieure du vagin sont absents chez la femelle. L'épaississement de l'épithélium coelomique était faible au jour e11.5 mais les PGCs migraient jusqu'aux crêtes génitales. Le développement subséquent des gonades était affecté (Miyamoto et coll., 1997). Au niveau du cortex cérébral, une interaction potentielle entre *Emx2* et divers membres de la famille des Fgfs et des Wnts (Shimogori et coll., 2004) suggère qu'une interaction similaire pourrait se produire dans les testicules.

1.3.11 Le gène *M33*

Le gène *M33* est l'homologue murin du gène *Polycomb* chez *Drosophila*; un gène important pour maintenir les gènes homéotiques et d'autres gènes impliqués dans le développement réprimés (Lewis, 1978; Wedeen et coll., 1986) en permettant des changements dans la structure de la chromatine (Paro et Hogness, 1991; Zink et Paro, 1989; Orlando et Paro, 1993). Les souris invalidées pour *M33* montrent des défauts des organes génitaux externes comme l'absence de pénis ou d'orifice vaginal. La corrélation entre le sexe chromosomal, les organes génitaux externes et les gonades a été vérifiée et plusieurs souris XY montraient une inversion de sexe de mâle à femelle ou des organes génitaux de types intersexes. Aucune des souris XY n'avaient des testicules bilatéraux; certains montrant des gonades indistinctes et d'autres ayant un testicule et un ovaire. La majorité des souris XX semblaient normales mais quelques unes n'avaient pas d'orifice vaginal et aucune n'était fertile. La gonadogénèse, tant chez les embryons XX que XY, était grandement retardée. Les défauts apparaissaient dès le jour e11.5, aucun cordon testiculaire n'était présent au jour e13.5 et le nombre de cellules en apoptose était élevé (Katoh-Fukui et coll., 1998). Les cibles de *M33* lors de la détermination du sexe demeurent inconnues.

1.3.12 Les gènes codant pour les récepteurs à l'insuline

Les voies de signalisation à l'insuline sont essentielles pour la croissance et le développement normal. Trois récepteurs à l'insuline sont connus : "Insulin receptor" (*Ir*), "Insulin growth factor 1 receptor" (*Igflr*) et "Insulin related receptor" (*Irr*). *Ir* et *Igflr* sont nécessaires pour le développement pré et post-natal. Les souris invalidées pour *Ir* meurent avant le jour e4.0 de cétoacidose (Accili et coll., 1996) tandis que les souris knock-out pour *Igflr* meurent à la

naissance de problèmes respiratoires et sont de taille réduite (Liu et coll., 1993). Par contre, les souris mutantes pour *Irr* sont viables et ne montrent aucun défaut visible (Kitamura et coll., 2001). Comme il est possible d'avoir la formation de récepteurs hybrides, Ir-Igflr et Ir-Irr (Fernandez et coll., 2001), des souris mutantes pour les trois récepteurs ont été fabriquées (Nef et coll., 2003). Les souris XY mutantes pour les trois récepteurs développent des ovaires et montrent un phénotype femelle complet. De plus, ces souris démontraient une expression de *Sry* et de *Sox9* grandement réduite. Les récepteurs à l'insuline pourraient jouer un rôle dans la prolifération cellulaire lors de la différenciation précoce des testicules (Nef et coll., 2003).

1.3.13 Le gène *FGF9*

Les "Fibroblast growth factors" (Fgfs) composent une famille d'au moins 22 facteurs qui jouent des rôles clefs dans une variété d'événements développementaux via une famille des récepteurs tyrosine kinase (Ornitz et Itoh, 2001). Dans les gonades des souris normales, *Fgf9* est détecté aux jours e11.5 et e12.5 chez les embryons mâles, mais pas chez les embryons femelles. Des souris invalidées pour *Fgf9* ont été générées (Colvin et coll., 2001). Le système reproducteur des souris mâles mutantes arborait un phénotype féminin allant de la réversion complète du sexe à une hypoplasie des testicules. De plus, les gonades XY des souris mutantes ont un mésenchyme réduit et les cellules de Sertoli et Leydig sont mal différenciées ou tout simplement perdues lors du développement embryonnaire. D'autres problèmes observés dans les gonades en formation incluent une réduction de la prolifération des cellules interstitielles d'au moins 70%. Finalement, des expériences *in vitro*, montrent que *Fgf9* induit la migration des cellules mésonéphriques dans les gonades XX (Colvin et coll., 2001). *Fgf9* semble être situé en aval de *Sry* et agit sur la prolifération du mésenchyme, la migration des cellules mésonéphriques et la différenciation des cellules de Sertoli. *Fgf9* serait particulièrement important pour deux étapes de la détermination du

sexe mâle tout juste en aval de l'expression de *Sry*; la prolifération de la population de cellules qui deviendront les cellules de Sertoli et la localisation cellulaire de *Fgfr2* qui elle-même coïncide avec l'initiation de l'expression de *Sry* et la localisation nucléaire de *Sox9* (Schmahl et coll., 2004). Finalement, des études effectuées sur des cellules de Sertoli cultivées en présence de *Fgf9* prolifèrent en plus grand nombre et forment des agrégats semblables à des cordons testiculaires et expriment deux isoformes du récepteur *Fgfr3* démontrant à nouveau l'importance de ce gène pour la prolifération et l'organisation des cellules de Sertoli (Willerton et coll., 2004).

1.3.14 Le gène *DAX1*

Le gène *Dax1* est un membre atypique de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux (Zanaria et coll., 1994). Il possède le domaine de liaison au ligand mais pas celui de liaison à l'ADN en doigt de zinc typique aux récepteurs nucléaires hormonaux. Cela suggère que *Dax1* est impliqué dans le contrôle des gènes via des interactions protéine-protéine. À ce jour, aucun ligand pour *Dax1* n'a été découvert. Des études montrent que *Dax1* peut aussi se lier directement sur des éléments "retinoic acid-responsive element" (RARE) (Zanaria et coll., 1994) mais qu'il reconnaît une structure de l'ADN plutôt qu'une séquence (Zazopoulos et coll., 1997). *Dax1* pourrait également se lier à l'ARN et aux polyribosomes (Lalli et coll., 2000).

Le gène *DAX1* a été isolé chez l'humain par clonage positionnel dans une région du chromosome Xp où se chevauchent deux locus reliés à des pathologies différentes soit "Adrenal Hypoplasia Congenital" (AHC) et "Dosage sensitive sex reversal" (DSS) (Zanaria et coll., 1994). Des mutations dans le gène *DAX1* entraînent la maladie AHC; les individus atteints de cette maladie souffrent d'une hypoplasie adrénérergique en plus d'hypogonadisme hypogonadotroïque chez les hommes. Cette maladie est également très similaire au phénotype des souris déficientes en *Sfl*. La duplication de la région Xp21.3 où se trouve *DAX1* cause la

maladie DSS. Cette duplication entraîne le développement femelle malgré la présence d'une copie fonctionnelle de *SRY* chez les hommes atteints (Ogata et coll., 1992; Bardoni et coll., 1994).

Un modèle de souris pour la maladie DSS a été créé afin de déterminer si *DAX1* était vraiment responsable de ce syndrome. Des souris portant de multiples copies de *Dax1* ont été fabriquées. Une inversion de sexe n'a par contre pas été observée; par contre, les souris avec la plus forte expression de *Dax1* montraient un retard dans la formation des testicules. Quand ces souris ont été croisées avec des souris ayant un allèle faible de *Sry* (expression retardée), une inversion de sexe complète de mâle à femelle a pu être observée (Swain et coll., 1998). Des souris déficientes en *Dax1* ont également été fabriquées et ces souris démontrent un développement ovarien complètement normal alors que les souris adultes mâles ont un problème au niveau de la spermatogénèse et de la gamétogénèse (Yu et coll., 1998a). De nouvelles études réalisées sur les embryons de souris invalidées entre les jours e11.5 et e17.5 montrent des problèmes de prolifération des cellules péritubulaires et des défauts précoces dans le développement et l'organisation des cordons testiculaires. Même si les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont présentes, les gonades sont désorganisées et le développement des cellules de Leydig est arrêté (Meeks et coll., 2003). Un bémol doit par contre être mis devant les résultats des souris invalidées car il a été récemment démontré qu'il existe deux isoformes à *Dax1* (*Nrob1* et *Nrob1a*) et qu'un des deux isoformes, *Nrob1a*, est toujours présents dans ces souris (Ho et coll., 2004). *Nrob1a* pourrait également se lier à *Sfl* et à l'ADN mais ne pourrait pas réprimer l'activité de transcription de *Sfl* et agirait comme antagoniste de *Nrob1* (Hossain et Saunders, 2004).

Dax1 est exprimé dans les glandes surrénales, les gonades, l'hypothalamus et l'hypophyse tant adultes qu'en développement (Ikeda et coll., 1996). Il y a donc coexpression de *Dax1* et *Sfl* dans de nombreux tissus suggérant que *Dax1* et *Sfl* puissent agir dans la même voie développementale. Dans les gonades en développement, chez l'humain, *DAX1* est exprimé au même taux dans les ovaires

et les testicules (Hanley et coll., 2000). Dans les souris XY, l'expression de *Dax1* augmente fortement dans les cellules de Sertoli au jour e12.5 puis l'expression disparaît tout de suite après. Par contre, son expression augmente dans les cellules interstitielles entre les jours e13.5 et e17.5. Dans les gonades des souris XX, *Dax1* est exprimé entre les jours e12.5 et e14.5, par la suite l'expression diminue (Ikeda et coll., 2001).

1.3.15 Le gène *Wnt4*

Wnt4 est un membre de la famille Wnt de molécules sécrétées et initialement considéré comme homologue du gène *wingless* chez *Drosophila*. Cette famille de facteurs de signalisation fonctionne de manière paracrine et affecte de nombreux changements développementaux comme celui des reins et l'angiogénèse (Stark et coll., 1994; Monkley et coll., 1996; Ishikawa et coll., 2001; Robitaille et coll., 2002). Les Wnts se lient aux membres des récepteurs de surface de la famille Frizzled et utilisent au moins trois voies de signalisation distinctes pour moduler l'expression des gènes (Pandur et coll., 2002). Il est généralement accepté que les mécanismes moléculaires élucidés pour *Wnt1* vont s'appliquer pour les autres Wnts incluant *Wnt4* mais pour l'instant, la voie de signalisation de *Wnt4* dans les gonades demeure inconnue.

Les études d'expression chez la souris ont démontré que le gène *Wnt4* commence à être exprimé dans l'épithélium coelomique des deux sexes au jour e9.5. À partir du jour e11.5, cette expression devient dimorphique; l'expression diminue dans les testicules en formation mais demeure forte dans les ovaires (Vainio et coll., 1999).

Récemment, un individu XY femelle ayant une grande duplication du chromosome 1p35 incluant *WNT4* a été identifié avec des organes génitaux ambigus (Jordan et coll., 2001). Il semble donc que *WNT4* soit le premier facteur essentiel à la différenciation des ovaires. Des souris invalidées pour *Wnt4* ont été

fabriquées et les embryons XX mutants montrent la présence d'organes génitaux internes et externes masculinisés alors que les souris XY semblent normales (Vainio et coll., 1999). De plus, les souris XX mutantes expriment des enzymes importants pour la biosynthèse des stéroïdes ce qui suggère que *Wnt4* pourrait être important afin d'empêcher le développement des cellules de Leydig dans les gonades XX (Vainio et coll., 1999). De nouvelles études effectuées sur des souris invalidées pour *Wnt4* démontrent un rôle pour *Wnt4* chez les souris mâles lors de la différenciation des cellules de Sertoli en aval de *Sry*, mais en amont de *Sox9* et *Dhh* (Jeays-Ward et coll., 2004). Un autre modèle de souris surexprimant *Wnt4* sous le contrôle de son propre promoteur a également été créé. Dans ce modèle, une inversion de sexe mâle à femelle n'a pas été observée chez les souris XY mutante. Par contre, une réduction dramatique des protéines stéroïdogéniques a été observée ainsi qu'une faible réduction du nombre de cellules germinales et la désorganisation de la vascularisation (Jordan et coll., 2003). Un modèle de souris similaire fabriqué par un autre groupe montre également un patron de vascularisation anormal mais sans problème de différenciation des cellules de Leydig (Jeays-Ward et coll., 2003).

Des études *in vitro* ont montré que *Wnt4* antagonisait la synergie fonctionnelle entre β -catenin et *Sfl* (Jordan et coll., 2003). D'autres études *in vitro* ont montré que *Wnt4* empêchait la migration des cellules endothéliales et stéroïdogéniques du mésonéphros dans les gonades XX empêchant la formation du vaisseau coelomique et la production de stéroïdes (Jeays-Ward et coll., 2003). De plus, une dernière étude suggère qu'une partie du rôle de *Wnt4* s'effectue via la follistatin (Yao et coll., 2004).

1.4 RÔLE ET INTÉGRATION DES GÈNES DANS LE MÉCANISME DE DÉTERMINATION ET DE LA DIFFÉRENCIATION DU SEXE CHEZ LES MAMMIFÈRES.

1.4.1 Dans la formation des gonades bipotentielles.

Les gènes *Sfl*, *Wt1*, *Lhx9* et *Emx2* jouent un rôle majeur dans la formation des gonades bipotentielles. Les souris invalidées pour ces gènes ne développent pas de gonades quelque soit le sexe. Les souris invalidées pour *Sfl* sont capables d'initier le développement des gonades mais à partir du jour e12.5, les gonades dégèrent par apoptose (Luo et coll., 1994). Chez les souris déficientes en *Wt1* et les souris déficientes en *Emx2*, les reins et les gonades ne sont pas formés (Kreidberg et coll, 1993; Miyamoto et coll., 1997) tandis que chez les souris déficientes en *Lhx9*, seulement les gonades ne sont pas formées (Birk et coll., 2000).

Outre un rôle dans la formation des gonades, des rôles dans la détermination du sexe est également possible pour ces gènes. Tout d'abord, des études *in vitro* ont permis de démontrer que l'isoforme -KTS de WT1 était capable de transactiver le promoteur humain de *SRY* (Hossain et Saunders, 2001) et que cette forme pouvait également lier et transactiver le promoteur *Sfl* murin (Wilhelm et Englert, 2002). Dans le cas de SF1, il est capable de transactiver les promoteurs humain et porcin de *SRY* (de Santa Barbara et coll., 2001; Pilon et coll., 2003). Pour ce qui est de *Lhx9*, des études ont démontré qu'il pouvait activer directement les gènes *Sfl* et *Wt1* (Wilhem et Englert, 2002). De plus, l'expression de *Sfl* est dramatiquement réduite chez les souris déficientes en *Lhx9* et ce dernier pourrait agir en amont de *Sfl* (Birk et coll., 2000). Finalement, peu de choses sont connues pour *Emx2* si ce n'est que l'expression de *Wt1* dans les crêtes urogénitales n'est pas affectée dans les souris invalidées pour *Emx2* (Miyamoto et coll., 1997).

1.4.2 Lors de la détermination et la différenciation du sexe

Trois critères déterminants sont généralement utilisés pour considérer qu'un gène pourrait être impliqué dans la détermination du sexe : L'expression spatio-temporelle des gènes dans les cellules pré-Sertoli, Une inversion de sexe visible chez les souris invalidées et des mutations présentes dans ces gènes chez des patients ayant une inversion de sexe phénotypique. Suite à la formation des gonades bipotentielles, au moins cinq gènes sont exprimés de façon précoce et pourraient participer directement à la détermination du sexe. Ce sont les gènes *Sry*, *Sox9*, *Dax1*, *Gata4* et *Fgf9*. Des mutations dans les gènes *SRY*, *SOX9* et *DAX1* ont été observées chez des patients qui souffrent d'une inversion du sexe (Sinclair et coll., 1990; Wagner et coll., 1994; Zanaria et coll., 1994). À ce jour, aucune maladie chez l'humain causant une inversion du sexe n'a été observée pour les gènes *FGF9* et *GATA4*. Par contre, les souris invalidées pour *Fgf9* montrent une inversion de sexe mâle à femelle pour la plupart des souris XY (Colvin et coll., 2001). Chez la souris, ces cinq gènes possèdent un patron d'expression dimorphique et temporel similaire dans les gonades embryonnaires. À ces cinq gènes, il faut rajouter *M33* et les récepteurs à l'insuline dont le patron d'expression dans les gonades n'a pas été étudié en détail mais dont les souris invalidées donnent également une inversion de sexe (Katoh-Fukui et coll., 1998; Nef et coll., 2003). Finalement, la perte de *DMRT1* chez l'humain peut également causer une inversion de sexe ce qui n'est par contre pas le cas chez la souris (résumé Ottolenghi et McElreavey, 2000; Raymond et coll., 2000).

1.4.2.1 Le contrôle de l'expression du gène *SRY*

Le gène *SRY* est le gène clef qui déclenche la cascade mâle de la détermination du sexe chez les mammifères. Il est le seul gène impliqué dans la détermination du sexe situé sur le chromosome Y et capable de déclencher la

formation des testicules (Koopman et coll., 1991). En son absence, les gonades prendront la voie de différenciation femelle dans un processus que l'on considère toujours comme une voie par défaut. Cependant, beaucoup de points demeurent nébuleux sur sa propre régulation et surtout sur son mode d'action.

Des études de base sur le promoteur du gène *SRY* humain ont été réalisées et celles-ci ont révélé différents sites d'initiation de la transcription ainsi qu'une région riche en GC contenant des éléments de reconnaissances pour le facteur de transcription SP1 (Vilain et coll., 1992; Su et Lau, 1993; Clépet et coll., 1993; Behlke et coll., 1993). Il a été également démontré que les éléments de régulation requis pour l'activation basale du promoteur humain étaient situés à l'intérieur des 310 premières paires de bases en amont du site du début de la traduction (Su et Lau, 1993). Les deux sites de liaison SP1 situés dans cette région ont été caractérisés sur le plan fonctionnel (Desclozeaux et coll., 1998) mais ils ne semblent pas importants pour l'expression tissu-spécifique de *SRY*. Des sites de liaisons potentielles pour des facteurs tels WT1, SF1, GATA4, SRY et SOX9 se retrouvent dans le promoteur de *SRY* de nombreuses espèces (Margarit et coll., 1998). Il a d'ailleurs été démontré que l'isoforme -KTS de WT1 pouvait lier et transactiver le promoteur *SRY* humain (Hossain et Saunders, 2001). D'autres études ont démontré que SF1 pouvait lier et transactiver les promoteurs de *SRY* porcine et humaine (De Santa Barbara et coll., 2001; Pilon et coll., 2003). Il a été montré que SOX9 pouvait transactiver le promoteur *SRY* porcine dans un modèle de boucle de rétroactivation potentiellement active chez les mammifères supérieurs (Daneau et coll., 2002). Finalement, des souris invalidées pour *Fog2* (Tevosian et coll., 2002) et les récepteurs à l'insuline (Nef et coll., 2003) ont montré une diminution de l'expression de *Sry*, suggérant un rôle pour *Fog2*, *Gata4* et pour les trois membres de la famille des récepteurs à l'insuline.

Contrairement aux séquences promotrices humaines et porcines, la séquence promotrice du gène *Sry* murin est très peu caractérisée. Une étude a permis l'identification d'une région de promoteur contrôlant la transcription de transcrits circulaires de *Sry* dans les cellules germinales mâles adultes et dans les

gonades embryonnaires après la période d'expression du transcrite linéaire (Dolci et coll., 1997). Également, la première lignée de souris transgéniques exprimant *Sry* et causant une inversion de sexe, utilisait un fragment génomique de 14,6 Kb incluant 7,5 Kb de séquences en 5' (Koopman et coll., 1991). La séquence promotrice nécessaire pour exprimer *Sry* et causer une inversion de sexe dans les modèles transgéniques a été, depuis ce temps, réduite à 4 Kb (Bowles et coll., 1999).

1.4.2.2 Les conséquences de l'expression de *SRY*

Les premières indications d'un des rôles possibles pour *Sry* sont issues d'études utilisant des gonades de souris chimériques dérivées de cellules XX et XY. Dans ces dernières, il a été démontré que la vaste majorité des cellules de Sertoli de étaient XY alors qu'une contribution équivalente des cellules XX et XY était identifiable pour les autres types de cellules. Ceci suggérait que le rôle de *Sry* était d'initier la différenciation des cellules de pré-Sertoli (Burgoyne et coll., 1988; Palmer et Burgoyne, 1991). De plus, on dénote des rôles pour *Sry* dans la migration des cellules mésenchymateuses à partir du mésonéphros vers les gonades (Buehr et coll., 1993; Merchant-Larios et coll., 1993; Martineau et coll., 1997; Capel et coll., 1999), la formation des cordons testiculaires (Tilman et Capel, 1999), la prolifération cellulaire et la vascularisation des gonades XY (Schmalh et coll., 2000). Par contre, on ignore si *Sry* induit directement ou indirectement ces processus, car aucune cible de l'action de *Sry* n'a pu être identifiée jusqu'à ce jour.

1.4.2.3 La relation entre *SRY* et *SOX9*

La très mince fenêtre d'expression du gène *Sry* dans les crêtes génitales des souris suggère que la protéine encodée par ce gène agirait en fait comme un interrupteur de la différenciation des testicules chez les mammifères. Son

expression transitoire fait en sorte que le gène *Sry* ne peut donc être responsable du maintien de l'identité et de la fonction des cellules de Sertoli. *Sry* doit donc permettre l'activation ou la répression d'autres gènes qui s'occuperaient de ces fonctions. Le meilleur candidat demeure présentement *Sox9*.

Le gène *Sox9* code, comme *Sry*, pour une protéine à boîte HMG, mais qui possède en plus, contrairement à *Sry*, un très bon domaine de transactivation (Sudbeck et coll., 1996). De plus, la protéine est fortement conservée à travers l'évolution de la *Drosophila* (deFalco et coll., 2003) au mammifère alors que *Sry* est seulement présent chez les mammifères. Également, l'expression ectopique d'un transgène exprimant *Sox9* dans les gonades XX est suffisante pour induire une inversion de sexe (Vidal et coll., 2001). Le patron d'expression de ces deux gènes dans les gonades embryonnaires tant chez la souris que chez l'humain est en parfait accord avec cette hypothèse (Morais da Silva et coll., 1996; Kent et coll., 1996; De Santa Barbara et coll., 2000). En effet, chez la souris, l'expression de *Sox9* augmente spécifiquement, dans les testicules, tout juste après l'expression de *Sry* au jour e12.5. Les résultats chez l'humain démontrent quant à eux un déplacement de la protéine SOX9 du cytoplasme vers le noyau des cellules de Sertoli suite à l'expression de *SRY* (De Santa Barbara et coll., 2000). De plus, il est possible que SOX9 contribue à une rétroactivation du gène *SRY* chez les mammifères supérieures mais pas chez la souris (Daneau et coll., 2002). Finalement, contrairement à *Sry*, il a été démontré que *Sox9* pouvait se fixer directement sur le promoteur de l'hormone Mis et l'activer (De Santa Barbara et coll., 1998; Arango et coll., 1999).

Deux hypothèses demeurent toujours sur le mécanisme par lequel *SRY* pourrait activer *SOX9*. La première est celle de l'activation directe où *SRY* se lie directement sur le promoteur de *SOX9* et transactive ce dernier. Une telle interaction n'a jamais été démontrée car il existe une région intergénique de 2 Mb en 5' et 500 Kb en 3' entourant le gène *SOX9* humain qui pourrait contenir des séquences régulatrices. La seconde hypothèse, mentionne que *SRY* inhiberait

l'expression d'un gène X qui lui inhiberait à son tour l'expression de *SOX9* dans les ovaires. *DAX1* avait été postulé pour être ce gène (McElreavey et coll., 1993) mais ceci n'a jamais été prouvé.

1.4.2.4 La régulation de l'expression du gène *MIS*

Présentement, il y a au moins sept facteurs qui contribuent au contrôle de l'expression de l'hormone MIS par les cellules de Sertoli pendant le développement embryonnaire. Ces sept facteurs de transcription sont : SF1, WT1, DAX1, SOX9, SOX8, GATA4 et FOG2.

Les séquences du promoteur *MIS* chez l'humain et la souris contiennent des sites de liaison pour le facteur SF1. Il a été démontré *in vitro* que Sfl peut transactiver le promoteur *Mis* de souris et que cette transactivation pouvait être synergisée par Wt1, un autre facteur impliqué dans la formation des gonades bipotentielles (Nachtigal et coll., 1998). Ces études démontrèrent également que Wt1 ne pouvait se lier directement sur le promoteur *Mis* et transactiver à lui seul le promoteur. Finalement, il a été démontré que le facteur Dax1 pouvait empêcher la synergie entre Sfl et Wt1 en se liant à Sfl.

En parallèle à ces études, il a été démontré que Sox9 pouvait également lier et transactiver le promoteur *Mis* (De Santa Barbara et coll., 1998). À partir d'études de mutagénèses *in vivo* des sites de liaison endogène de Sox9 sur le promoteur *Mis*, ont également démontré l'importance de Sox9 pour l'activation de *Mis* (Arango et coll., 1999). Plus récemment, de nouvelles études ont montré que Sox8 pouvait également se lier aux sites de liaisons Sox sur le promoteur proximal de *Mis* et activer son expression quoiqu'à un niveau plus faible que Sox9. Des synergies entre Sox9 et Sfl, et Sox8 et Sfl sont également possible pour augmenter la transactivation de *Mis* par des interactions protéine-protéine (Schepers et coll., 2003).

Finalement, le facteur Gata4 intervient également dans la transactivation du promoteur proximal *Mis*. Tout comme Sf1, Sox9 et Sox8, Gata4 peut se lier et augmenter l'activation de *Mis* directement (Viger et coll., 1998). Tout comme Wt1, Sox9 et Sox8, Gata4 peut également agir en synergie avec Sf1 (Tremblay et Viger, 1999). Cette synergie peut aussi être inhibée par la liaison directe de Dax1 à Sf1 (Tremblay et Viger, 2001). En dernier lieu, l'activation de *Mis* par Gata4 est également réduite par la présence de concentration croissante de Fog2 *in vitro* (Robert et coll., 2002; Anttonen et coll., 2003).

1.4.2.5 Les nombreux rôles de SF1

L'expression de *SF1* est nécessaire à quatre moments différents lors de la détermination puis de la différenciation des testicules et pour la maturation du système génital mâle. Premièrement, *SF1* est impliqué dans la formation des gonades bipotentiels avant la détermination du sexe; l'expression de *Sf1* chez la souris débute au jour e9.0, précédant l'expression de *Sry* (e10.5) et disparaît à partir du jour e12.5 chez la femelle alors qu'elle persiste dans les cellules de Sertoli chez le mâle (Ikeda et coll., 1994). Les souris déficientes en *Sf1* n'ont pas de gonades et développent un système génital interne et externe femelle (Luo et coll., 1994). De plus, SF1 est capable de lier et de transactiver *in vitro* les promoteurs *SRY* humain et porcin (Hossain et Saunders, 2001; de Santa Barbara et coll., 2001; Pilon et coll., 2003). Deuxièmement, SF1 est impliqué dans la différenciation des testicules par le contrôle de l'expression de *MIS* dans les cellules de Sertoli. Il a été montré que Sf1 pouvait lier et transactiver directement le promoteur *Mis* murin en synergie avec Wt1, Sox9, Sox8 et Gata4 (Nachtigal et coll., 1998; Arango et coll., 1999; Schepers et coll., 2003; Tremblay et Viger, 1999). Troisièmement, SF1 serait nécessaire plus tard dans le développement des testicules pour la production de stéroïdes par les cellules de Leydig. En effet, de nombreuses études ont démontré un rôle direct pour SF1 dans la transactivation du gène "P450 side chain cleavage" (*P450scc*) et de d'autres enzymes

stéroïdogéniques (hydroxylases) (Clemens et coll., 1994; Takayama et coll., 1994; Morohashi et coll., 1994; Zhang et Mellon, 1996; Lynch et coll., 1993). Finalement des études ont démontré que SF1 était aussi impliqué dans le contrôle de l'expression de *INSL3* et donc impliqué dans la descente des testicules (Zimmermann et coll., 1998, 1999). La diversité des rôles de SF1 démontre la complexité des processus de la détermination et de la différenciation du sexe ainsi que la difficulté de séparer ces deux processus en deux compartiments distincts.

1.4.2.6 La relation entre SF1 et DAX1

Les études sur la fonction de DAX1 pendant la stéroïdogénèse ont révélé plusieurs mécanismes possibles du mode d'action de DAX1. En culture cellulaire, Dax1 réprime l'activation de la transcription de gènes stéroïdogéniques de la famille du cytochrome P450 (*Cyp11A*, *Cyp17* et *Cyp19*) par Sfl (Lalli et coll., 2003). La cotransfection de *SF1* et *DAX1* dans des cellules choriocarcinomiques montre une diminution de 75% de la réponse d'un gène rapporteur artificiel comparativement à la transfection de *SF1* seul (Ito et coll., 1997). Cette répression était de nature dose dépendante. Des expériences ont récemment démontré que les motifs LXXLL en N-terminal étaient nécessaires à DAX1 pour jouer son rôle de répresseur (Lehmann et coll., 2002). Des essais de transfection transitoire ont démontré que Dax1 ne pouvait réprimer l'activation de la transcription de *Cyp11A* par Sfl quand les motifs LXXLL étaient mutés. Ceci était probablement causé par une perte d'interaction entre Sfl et Dax1 (Suzuki et coll., 2003). Finalement, une interaction directe entre Sfl et Dax1 via les motifs LXXLL a été démontrée (Ito et coll., 1997). Il est probable que DAX1 et SF1 interagissent de la même manière pendant la formation des testicules. *In vitro*, Dax1 réprime l'activation de la transcription de *Mis* par Sfl. Les études de transfection effectuées à partir des cellules immatures de Sertoli de rats ont démontré que l'interaction directe de Dax1 avec Sfl empêche la synergie entre Sfl et Gata4 afin d'activer le promoteur *Mis* (Tremblay et Viger, 2001). Cette répression n'était pas vue lorsqu'une forme

mutante de *Dax1* (élimination des motifs LXXLL) était utilisée (Tremblay et Viger, 2001). *Dax1* empêcherait de façon similaire la synergie entre *Sfl* et *Wt1* (Nachtigal et coll., 1998) et *Sfl* et *Sox9* ou *Sox8* (Schepers et coll., 2003).

Dans une version différente de l'œuf ou la poule, si *Dax1* est nécessaire pour moduler la fonction de *Sfl* via une interaction protéine-protéine, *Sfl* est nécessaire pour moduler l'expression de *Dax1* en se liant directement sur le promoteur de ce dernier. En effet, il existe plusieurs sites reconnus par *Sfl* sur le promoteur de *Dax1*. Des études *in vitro* ont confirmé que *Sfl* était indispensable à la transcription de *Dax1* (Yu et coll., 1998a; Kawabe et coll., 1999). Les résultats *in vitro* ont été confirmés par des études *in vivo* qui démontrèrent que *Dax1* n'est pas exprimé dans les crêtes génitales des souris déficientes en *Sfl* (Ikeda et coll., 2001). *Sfl* jouerait un rôle dans l'activation de *Dax1* en synergie avec la β -caténine, molécule se situant à la fin de la voie de signalisation de *Wnt4* (Mizusaki et coll., 2003). Par ailleurs, *Sfl* serait également nécessaire pour transactiver *Wnt4* (Leers-Sucheta et coll., 1997; de Santa Barbara et coll., 1998). Comme *Dax1* antagonise l'expression de *Sfl* des souris mutantes pour *Dax1*(-/-) *Sfl*(+/-) ont été créées. Ces souris, exprimaient encore plus faiblement *Dhh* que pour la souris *Sfl*(+/-) tout comme l'expression de *Mis* au jour e11.5; par contre, cette diminution était transitoire. Ces résultats suggèrent que même si *Sfl* et *Dax1* sont des antagonistes transcriptionnels pour plusieurs cibles *in vitro*, ils agissent en coopération ou indépendamment *in vivo* (Park et coll., 2005). Ceci tant à démontrer une fois de plus la complexité du mécanisme de la détermination et de la différenciation du sexe et surtout que l'on se retrouve en présence d'un réseau plutôt que devant une suite d'événements linéaires.

1.4.3 Lors de la différenciation des organes sexuels

Les bases de la différenciation du sexe chez les mammifères sont issues des travaux d'Alfred Jost (Jost, 1947) qui a démontré que les testicules doivent sécréter des substances permettant la conservation des canaux de Wolff et la

régression des canaux de Müller. Selon ses expériences, la différenciation sexuelle chez la femelle s'établissait donc par défaut.

Chez le mâle, il est aujourd'hui connu que la conservation des canaux de Wolff se fait grâce à la production et la sécrétion de la testostérone par les cellules de Leydig tandis que la régression des canaux de Müller est causée par la synthèse et la sécrétion de MIS par les cellules de Sertoli. La testostérone est aussi métabolisée en divers stéroïdes qui vont permettre la masculinisation des organes sexuels externes et de certaines parties du cerveau (Roberts et coll., 1999). Une dernière hormone, *Insl3*, entre en ligne de compte pour la différenciation des organes sexuels mâles. *Insl3* est sécrétée par les cellules de Leydig et est nécessaire pour la descente des testicules dans le scrotum (Zimmermann et coll., 1999). *Insl3* active une voie de signalisation pas encore définie en se fixant à un récepteur membranaire nommé "G protein-coupled receptor affecting testicular descent" (Great). Les souris ayant une déficience en *Great* présentent un phénotype similaire aux souris déficientes en *Insl3*, c'est-à-dire un cryptorchidisme bilatéral et intra-abdominal. L'expression de ces deux gènes est contrôlée par *Sf1* (Bogatcheva et Agoulnik, 2005).

Avec l'analyse des souris invalidées pour *Wnt4*, il a été démontré que la molécule *Wnt4* était nécessaire au développement des canaux de Müller dont dérive le développement des organes sexuels femelles. De plus, en absence de signalisation via *Wnt4*, la stéroïdogénèse est initiée au dans les ovaires libérant une certaine quantité de testostérone permet la rétention des canaux de Wolff chez la femelle (Vainio et coll., 1999). Il semblerait que *Wnt4* nuirait à la migration des cellules endothéliales et des cellules stéroïdogéniques à partir du mésonéphros dans les gonades XX. Ce faisant, la différenciation des cellules de Leydig qui produisent les hormones stéroïdiennes et une forte vascularisation nécessaire pour transporter les hormones stéroïdiennes ne pourraient être établie dans les gonades XX (Jeays-Ward et coll., 2003).

1.4.4 Schéma du processus de la détermination et de la différenciation des testicules chez les mammifères euthériens.

Un résumé des interactions possibles entre les facteurs identifiés comme étant impliqués dans le développement des testicules est présenté à la figure 1.1

1.5 LA COMPLEXIFICATION DES MÉCANISMES DE LA DÉTERMINATION ET DE LA DIFFÉRENCIATION DU SEXE CHEZ LES MAMMIFÈRES.

Jusqu'à présent, la découverte de nouveaux gènes impliqués dans les processus de détermination et de différenciation du sexe provenait majoritairement d'études de patients humains présentant une anomalie de leurs organes génitaux ou par la fabrication de souris invalidées généralement pour l'étude d'autres tissus et systèmes. Au cours des quatre dernières années, les études de criblages différentiels à grande échelle comparant les testicules des ovaires embryonnaires ou les testicules à diverses étapes du développement sont devenues la source initiale d'information afin d'identifier de nouveaux gènes candidats ayant un impact au cours de ces processus. Par exemple, une étude comparant les gènes exprimés dans les testicules et les ovaires en développement au jour e12.5 a permis d'identifier 54 nouveaux gènes présentant une expression dimorphique entre ces deux tissus (McClive et coll., 2003) alors qu'une autre étude similaire a permis d'identifier 68 gènes présentant un patron d'expression dimorphique (Bowles et coll., 2000b). D'autres expériences similaires ont été réalisées par divers groupes de recherche (Nordqvist et Töhönen, 1997; Wertz et Hermann, 2000; Menke et Page, 2002; Smith et coll., 2003b; Boyer et coll., 2004, Small et coll., 2005). Tous ces gènes ont le potentiel d'être en amont ou en aval du processus de la détermination et de la différenciation du sexe.

1.6 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Notre laboratoire a comme objectif d'étudier la détermination et la différenciation du sexe chez les mammifères d'un point de vue évolutif et de faire le pont entre les études effectuées chez l'humain et celles effectuées chez la souris. Pour ce faire, des souris transgéniques hétérologues exprimant des marqueurs de fluorescence sous le contrôle de divers promoteurs de gènes porcins et humains impliqués dans la détermination du sexe ont été fabriquées et des études d'expression ont été effectuées selon l'hypothèse que peu importe le fait que les séquences promotrices des gènes soient fortement conservées ou non, le contrôle de ces dernières devrait lui être conservé. Deux gènes diamétralement opposés durant l'évolution dans la conservation de leurs séquences tant promotrices que codantes, *DMRT1* et *SRY*, ont été étudiés plus en détail pour prouver cette hypothèse.

Le premier objectif de cette thèse était d'étudier, par des études d'expression, la conservation fonctionnelle des séquences régulatrices en cis du promoteur porcine de *DMRT1*, un gène fortement conservé, apparu chez les invertébrés et présent dans l'évolution depuis 600 millions d'années dans un modèle de souris transgéniques hétérologues.

Le second objectif de cette thèse était d'étudier, par des études d'expression la conservation fonctionnelle des séquences régulatrices en cis du promoteur porcine ou humaine de *SRY*, un gène très peu conservé, apparu chez les mammifères et présent dans l'évolution depuis 130 millions d'années dans des modèles de souris transgéniques hétérologues.

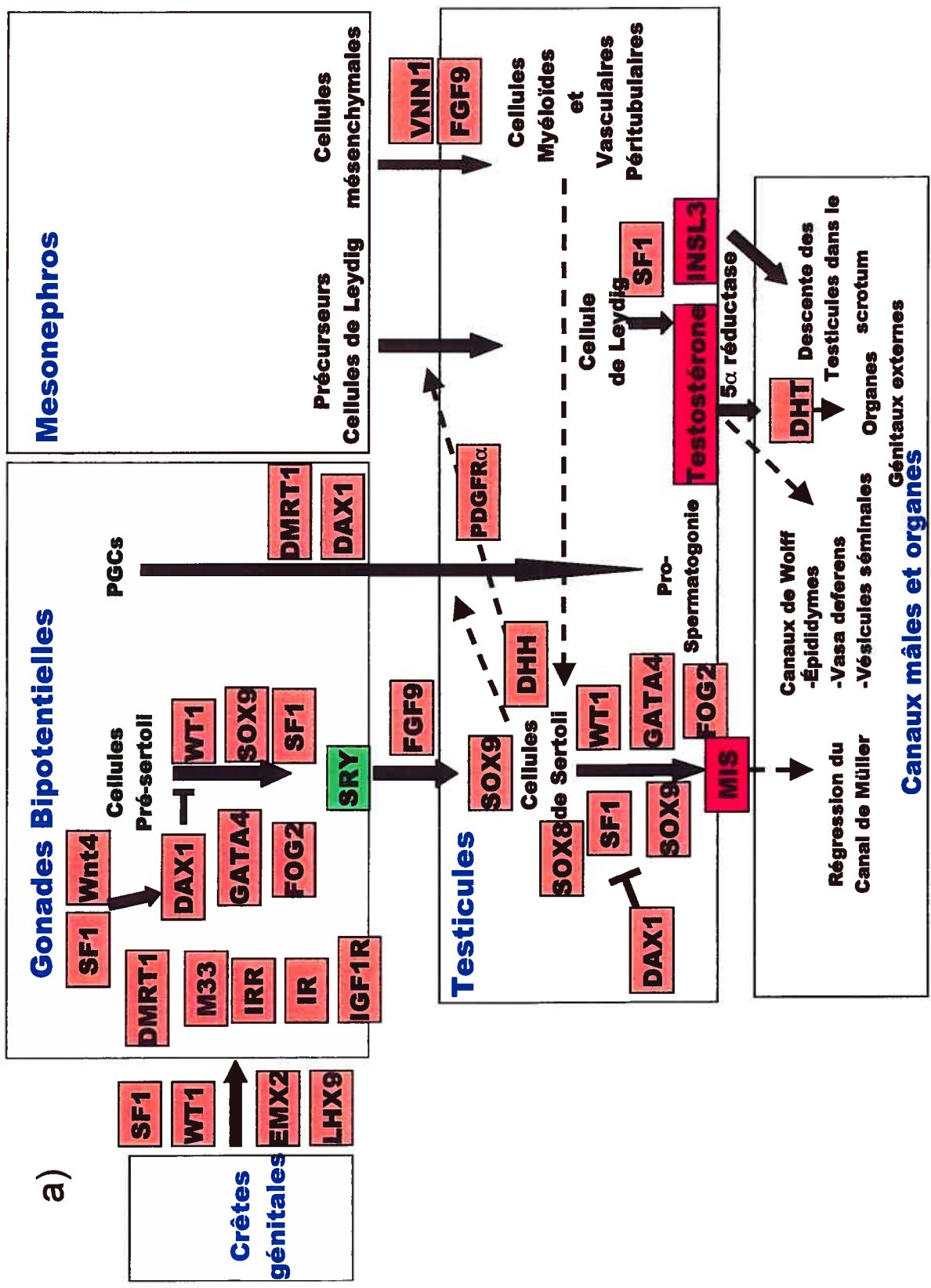
Avec les souris transgéniques en main et suite aux résultats des études d'expression, nous avons par la suite décidé d'ajouter d'autres objectifs en utilisant ces souris comme un outil.

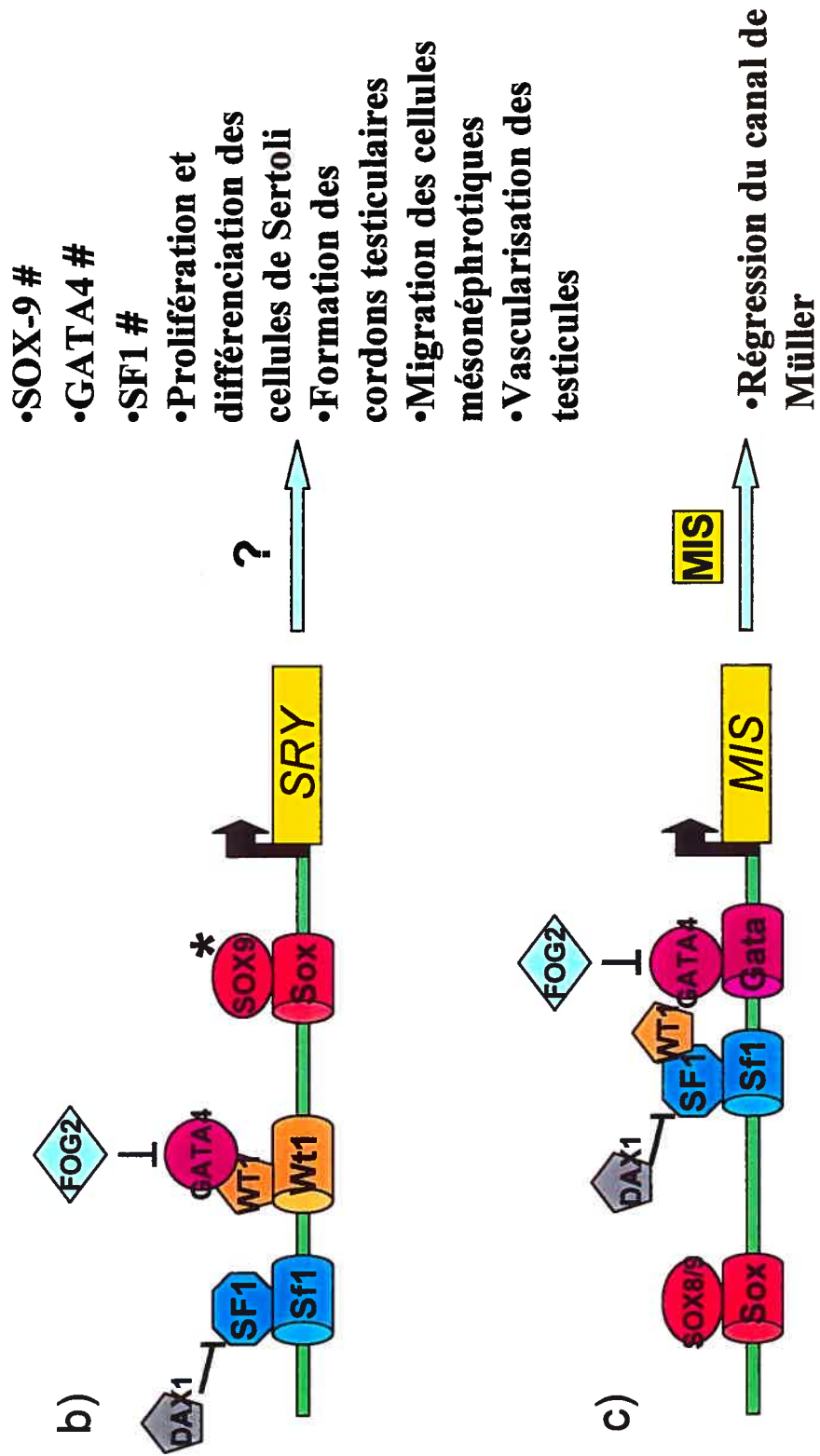
Tout d'abord, nous avons comme objectifs de caractériser le profil d'expression des cellules pré-Sertoli au début de la différenciation du sexe et

d'identifier de nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués dans les processus de la détermination et de la différenciation du sexe. Selon l'hypothèse que les cellules pré-Sertoli sont les premières à prendre la voie de différenciation mâle et les gènes clés pour la détermination du sexe devrait être exprimés dans ces cellules.

Finalement, suite aux résultats des études d'expressions avec les gènes rapporteurs sous le contrôle des promoteurs *SRY* et *GATA4* (pas décrit ici). Une nouvelle hypothèse qui nous est apparue est qu'une sous-population des cellules pré-Sertoli migrent à partir de la crête neurale pour déclencher le processus de la formation des testicules. Nous avons comme dernier objectif de prouver cette hypothèse par la mise au point d'un système de culture de tissus et par des études de transplantation de gonades.

FIGURE 1.1 Schéma des étapes importantes de la détermination et de la différenciation des testicules chez les mammifères euthériens. **a-** Représentation globale de la détermination et de la différenciation du sexe chez les mammifères euthériens basés sur les études effectuées sur les souris invalidées, les études de culture de cellules et les inversions de sexe chez l'humain. Les gènes *SF1*, *WT1*, *EMX 2* et *LHX9* sont impliqués dans la formation des gonades bipotentiels. Les gènes *SRY*, *SOX9*, *DAX1*, *GATA4*, *FGF9*, *M33* et *DMRT1* sont impliqués dans le processus de la détermination du sexe mâle. Très peu d'informations concernant l'interaction entre chacun des gènes sont connues mais la majorité des gènes possèdent sur leur séquence promotrice les sites de liaisons pour les autres gènes et leur expression peut être activée ou inhibée *in vitro* par ces gènes. Ainsi, *DAX1*, *LHX9*, *WT1* et *SOX9* se lient au promoteur *SF1*, *WT1* et *SF1* au promoteur *DAX1*, *GATA4* au promoteur *DMRT1* et *LHX9* au promoteur *WT1*. **b-** Contrôle du promoteur de *SRY*. Les protéines *SF1*, *WT1* et *SOX9* se lient directement au promoteur *SRY* et activent son expression alors que *GATA4* agit en synergie avec *WT1* en se liant à cette dernière. *DAX1* et *FOG2* inhibent l'expression de *SRY* en interférant respectivement entre la liaison *SF1*/promoteur *SRY* et la synergie entre *SF1* et *WT1* et entre la liaison *GATA4*/*WT1*. * L'effet de *SOX9* sur le promoteur *SRY* ne se retrouve pas sur le promoteur murin. Suite à l'expression de *SRY*, de nombreux phénomènes se produisent mais la suite d'événements menant de l'expression de *SRY* à ces phénomènes demeure inconnue. **c-** Contrôle du promoteur *MIS*. Les protéines *SOX8/9*, *SF1* et *GATA4* se lient directement au promoteur *MIS* et activent son expression. De plus, *GATA4* et *SF1* agissent en synergie. *WT1* agit en synergie avec *SF1* tandis que *DAX1* et *FOG2* inhibent l'expression de *MIS* en interférant respectivement entre la liaison *SF1*/promoteur *MIS* et entre la liaison *GATA4*/promoteur *MIS*.





CHAPITRE II

**Conservation of the function of *DMRT1* regulatory sequences in
mammalian sex differentiation**

ALEXANDRE BOYER, SAFFRON DORNAN, ISABELLE
DANEAU, JACQUES G. LUSSIER, AND DAVID W. SILVERSIDES

GENESIS 34: 236-243, 2002

**Conservation of the function of *DMRT1* regulatory sequences in
mammalian sex differentiation**

Alexandre Boyer¹, Saffron Dornan^{1,2}, Isabelle Daneau¹, Jacques Lussier¹ and
David W. Silversides^{1,*}

¹ Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Québec,
Canada.

² Present address : Dept. of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, U.K.

Short title : pig *DMRT1* promoter and transgenic mice

Key words : sex differentiation, pig *DMRT1* promoter, transgenic mice, GFP, Cre

* Author for correspondence at address ¹ 

ABSTRACT

Among genes involved in sex determination and differentiation, *DMRT1* is the only one characterized to date containing a domain (the DM domain) that is conserved between phyla. To study *DMRT1* transcriptional regulation within mammalian phyla, we have generated transgenic mice that express green fluorescent protein (GFP) or Cre-recombinase (Cre) under the control of 2.6 Kb of pig *DMRT1* 5' flanking sequences (pDMRT1p-GFP and pDMRT1p-Cre, respectively). Within the pDMRT1p-GFP positive mice, GFP expression was observed in the XY genital ridge by embryonic day 11.5 (e11.5) and remained detectable during testis embryonic development to birth. GFP expression was restricted within testis cords as soon as cords were detectable. No fluorescence was observed in developing ovaries, although more sensitive RT-PCR analysis revealed transgene expression in embryonic ovaries from e13.5 to e15.5. RT-PCR performed on Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS) purified GFP fluorescent cells from e14.5, e17.5 and e19.5 developing testis showed that GFP expression was restricted to cells expressing the endogenous mouse *Dmrt1*. GFP fluorescent cells also expressed *Mis* and *Oct4* showing that the transgene is expressed in both Sertoli cell and germ cell compartments. In postnatal testis, transgene expression was detectable by GFP fluorescence from P0 to P21 in mice heterozygous for the transgene and through adulthood in mice homozygous for the transgene. In pDMRT1p-Cre positive mice, Cre expression was detected within the genital ridges of both XY and XX embryos. We conclude that *DMRT1* regulatory mechanisms during sexual differentiation are functionally conserved across mammalian evolution. The transgenic mouse lines described should provide useful markers system for studies involving *Dmrt1* gene expression during sex differentiation.

INTRODUCTION

Sex determination and differentiation in animals are developmental processes characterized by a surprising lack of structural conservation in key genes between and even within phyla. Currently, the only exception to this statement comes from the *Drosophila* doublesex (*dsx*) (Baker and Ridge, 1980) and *C. elegans* *mab3* genes (Shen and Hodgkin, 1988). Both these genes contain a DM domain consisting of a zinc finger-like DNA binding motif (Erdman and Burtis, 1993; Raymond et al., 1998) and perform functions related to sexual development such as regulating yolk genes transcription, male specific sense organs (Baker and Ridge, 1980), differentiation and mating behaviour. *In vivo*, these genes are also partially interchangeable. *DMRT1* was the first DM domain gene to be cloned in humans and mice (Raymond et al., 1998, 1999b). In humans, *DMRT1* maps to the autosomal locus 9p24.3 (Fleitjer et al., 1998; Guioli et al., 1998), which, when hemizygous, is associated with defective testicular development and XY feminization (Bennet et al., 1993; Crocker et al., 1998; Veitia et al., 1998; reviewed in Ottolenghi and McElreavey, 2000). In the mouse, *Dmrt1* is expressed in the genital ridge of both sexes at similar levels between e10.5 to e13.5 of gonadal development. Between e14.5-e15.5, *Dmrt1* expression declines in the ovaries but is upregulated in the testis, consistent with a role in testis differentiation (Raymond et al., 1999a; DeGrandi et al., 2000). *Dmrt1* is expressed in both Sertoli cell and germ cell compartments (Raymond et al., 1999a). More recently, a deletion allele of the mouse *Dmrt1* gene was generated and shows that *Dmrt1*, in the mouse, is not required for sex determination but is essential for postnatal testis differentiation. In fact, the morphologic problems seen in *Dmrt1*^{-/-} mice are similar to those seen in humans who are hemizygous at locus 9p24.3. *Dmrt1* is not necessary for ovarian development as female mice are fully fertile (Raymond et al., 2000). Numerous *DMRT1* orthologues have been cloned in additional species including birds (Smith et al., 1999; Nanda et al., 2000; Ellengren, 2001), fish (Guan et al., 2000, Marchand et al., 2000., Brunner et al., 2001), reptiles (Kettlewell et al., 2000) as

well as mammals (Chen and Heckert, 2001). Expression studies are consistent with a role in male gonad development.

To further comparative structural and functional studies of *DMRT1* in mammals, we have cloned the pig *DMRT1* open reading frame as well as 5' flanking sequences (Genbank AF216651), and will report endogenous expression profiles elsewhere. We now report the use of 2.6 kb of pig *DMRT1* 5' flanking sequences to drive reporter transgene expression (*GFP*, *Cre*) in transgenic mice. The results indicate that pig *DMRT1* and mouse *Dmrt1* genes display high structural and functional conservation of promoter sequences.

MATERIAL AND METHODS

Cloning of pig DMRT1 5' region

A 909 bp fragment representing exon 1 and part of exon 2 (Genbank AF216651) was amplified by PCR from previously subcloned cDNA and used as a probe to screen a pig genomic DNA library constructed in λ EMBL 3 (Clontech). Forty cycles of amplification were performed using 45 sec at 95°C, 45 sec at 54°C and 1 min at 72°C. The primers used were pDMRT.D 5'-GGCTGCAGAGCAGAGGCT (sense) and pDMRT.4 5'-TGGTTTCCTGTCTGACCA (antisense).

Two screens were performed using ^{32}P labelled probe (Megaprime DNA labeling systems, Amersham Life Science). Plaques were lifted onto nylon membranes using standard procedures (Sambrook et al., 1989). After 2h prehybridization at 65°C, overnight hybridization at 65°C was performed followed by washes for 20 min in 3 X SSC + 0.1% SDS, 20 min in 2 X SSC + 0.1% SDS and 40 min in 1 X SSC + 0.1% SDS at 65°C. Membranes were exposed on BioMax film (Kodak) for 24h or 48h. A primary PCR amplification was performed on the positive clones using primers pDMRT.5 5'-TGCACTTCTGCACTGGCA and EMBL3.A 5'-CTCGTGAAAGGTAGGCGGATCTG or EMBL3'.1 5'-ACTCGTCCGAGAATAACGAGTGG. Nested amplifications were then performed

using pDMRT.9 5'-GCCTTGCCCTGCGGAGGTGGC and EMBL 3'B ACTCTAGGCCTCACTGGCCTAATA or EMBL3'.2 5'-

CGACTCTAGGCCTAAATGGCCATT. The PCR conditions were : forty cycles of amplification were performed using 45 sec at 95°C, 45 sec at 56°C and 10 min at 72°C. The polymerase used was Expand High-Fidelity (Roche). A 2730 bp fragment was obtained and subcloned in pGEMt (Promega).

Transgene construction

A transgene expressing GFP-f under the control of the 2.6Kb 5' flanking region of pig DMRT1 was constructed. To realize this, by PCR, porcine DMRT1 5' flanking sequences were amplified with adaptors containing restriction sites for *SalI* (sense) 5'-GTCGACAATACGACTCACTATAGGGAGCT and *BglIII* (antisense) 5'-AGATCTGGTGCCCCAGGAGAAGCGC. This fragment was subcloned in pGEMt (Promega). The 2672 bp fragment was then subcloned into a modified version of pEGFP-f (Clontech), into *SalI* and *BamHI* sites upstream of the coding sequences for EGFP, to generate the reporter transgene pDMRT1p-GFP. To put the Cre-recombinase under the control of the 2.6 kb of pig *DMRT1* 5' flanking sequences, pDMRT1p-GFP plasmid was cut with *SalI* and *BglIII* and the plasmid GFP Δ -Cre was cut with *XhoI* and *EcoRI*. A ligation was performed in the presence of adaptors *BglIII* and *EcoRI* to generate the plasmid pDMRT1p-Cre.

Transgenic mice and embryo studies

To generate transgenic mice, the pDMRT1p-GFP transgene was linearized with *SalI* and *NotI* while the pDMRT1p-Cre transgene was linearized with *NotI*, followed by gel purification (QIAquick gel extraction kit, QIAGEN). Transgenic mice were generated via conventional pronuclear microinjection (Hogan et al., 1994) using embryos derived from FVB/N inbred mice (Taketo et al., 1991). To allow visual identification of transgenic animals via pigmentation and to aid in

estimating transgene expression, a tyrosinase minigene was co-injected (Méthot et al., 1995). It should be noted that the construct does not contain the endogenous 3' UTR, but rather a polyadenylation signal derived from SV40.

For embryo studies, noon on the day that a vaginal plug was observed was designated as e0.5. For postnatal studies, the day of birth was designated as P0 (postnatal day).

pDMRT1p-GFP

Genomic DNA was generated from tail cut tissue using Dneasy tissue DNA extraction kit (QIAGEN). Putative transgenic offspring were screened for the presence of the transgene via PCR, using the sense primer DMRT1.F 5'-CACCACTCAGAGCGTTGTGAGT, and the antisense primer EGFP.4 5'-AGCTCGACCAGGATGGGCACA. Forty cycles of amplification were performed using 45 sec at 95°C, 45 sec at 64°C and 1 min at 72°C. The polymerase used was Ampli-Taq (Perkin-Elmer). Twelve transgenic founders were identified and eleven lines were established.

Via fluorescence microscopy at e14.5, a time when *Dmrt1* is strongly expressed, transgenic mice from three lines (9C, 11A and 11B) were observed to express the reporter transgene, and were studied in more detail. Gonads from e10.5 to birth and from P1 to P28 were examined for fluorescence using a Leica MZ FLIII stereomicroscope equipped with epifluorescence and filter sets optimized for EGFP (Omega Optical). Genital ridges of transgenic embryos were identified by retinal pigmentation due to co-integrated tyrosinase transgene and gonads were studied for both male and female embryos. Transcription of the *GFP* transgene was tested via RT-PCR in developing ovaries at e13.5, e15.5 and e17.5; mRNA was extracted using the Oligotex direct mRNA Mini kit (Qiagen). Reverse transcription was performed using Superscript II reverse transcriptase (Gibco), and a hybrid polydT primer specific for the SV40 poly dT sequences found in the transgene (SV40-3'.3 5'-T(14)GCAGTGAAAAAATG). A PCR was then performed using SV40-3'.3 and EGFP.C primer (5'-ACAACATCGAGGACGGCAGGTGCA), based on *GFP*

coding sequences. Forty cycles of amplification were performed using 45 sec at 95°C, 45 sec at 60°C and 1 min at 72°C, to amplify a band of 510 bp. *Gapdh* was used as a control of the quality of mRNA extraction; *Gapdh* primers were designed to amplify a fragment of 530 bp of the mouse cDNA sequence. RT-PCR was performed with a polydT primer 5'-GGATCCAAGCTTGAATTCTAATACGACTCACTATAGT(17) and PCR with primers GAPDH.A 5'-AGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA (sense) and GAPDH.1 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTAGC (antisense). Amplification was as described for the GFP transgene. Results presented are from line 11A heterologous for the transgene.

pDMRT1p-Cre

Genomic DNA was generated as previously described. Presence of the transgene in genomic DNA of offspring was detected by PCR using the sense primer 5'- TGGGTGCTTCCCTTGCAGCCA and the antisense primer 5'-TTGCTGTCACCTGGTCGTGGCA. Forty cycles of amplification were performed using 45 sec at 95°C, 45 sec at 60°C and 1 min at 72°C, the polymerase used was Taq (Perkin-Elmer). Three transgenics founders were identified and three lines were established.

Expression of Cre-recombinase was detected by crossing transgenic mice for pDMRT1p-Cre with R26R-EYFP mice previously described (Srinivas et al., 2001). Expression of YFP in adult gonads of double transgenic mice was determined by fluorescence microscopy. Two lines (1 and 2B) expressed the reporter transgene. Double transgenic embryos from e8.5 to birth and developing gonads from e11.5 to birth were examined for YFP expression as previously described.

Fetuses were collected from timed mating. Paired urogenital ridges, gonad/mesonephros complexes or gonads were dissected. All mesonephros and other non-gonadal tissue were carefully removed for FACS-SCAN studies.

FACS-SCAN studies

To isolate fluorescent cells from e14.5, e17.5 and e19.5 embryos, developing testes were dissected from timed mating embryos and digested for 30 min at 37°C in M2 media (Sigma) supplemented with collagenase (50 U ml⁻¹) and dispase (2.4 U ml⁻¹). Fluorescent cells were then purified using FACS isolation on a FACSTAR-Plus FACS Machine (Becton Dickman) equipped with an EGFP filter. For each of the days tested, 20,000 fluorescent cells as well as non-fluorescent cells were recovered; fluorescent cells accounted for 1.8%, 3.2% and 3.2% respectively of total cells processed. mRNA was then extracted using the Oligotex direct mRNA Mini kit (Qiagen). *Dmrt1* primers were designed based on mouse cDNA sequences to generate a 416 bp band via PCR amplification. The sense primer was mDMRT.C 5'-CAGAGCATGTCCCAGATCCTTA and the antisense primer was mDMRT.11 5'-CTTCTTGCAGATGGTAGTCTGG. Similarly, *Mis* primers 5'-TGGCTAGGGGAGACTGGAGAACAG (sense) and 5'-CTGCGGAAAGGCATGGTGTCCA (antisense) and *Oct4* primers 5'-GATGGCATACTGTGGACCTCAGGTTG (sense) and 5'-CTGATTGGCGATGTGAGTGATCTGC (antisense) were designed to generate a 459 bp and a 577 bp (Raymond et al., 1999a) band via PCR amplification. An RT-PCR for *Gapdh* was performed as a control of the quality of mRNA extraction, as previously described for pDMRT1p-GFP mice. Reverse transcription was performed using mDMRT.10 primer (5'- AACTTGGTGAGCCAGGCACTT) for *Dmrt1* and polydT (5'-GGATCCAAGCTTGAATTCTAATACGACTCACTATAGT(17)) for *Mis*, *Oct4* and *Gapdh* with Superscript II reverse transcriptase (Gibco). PCR amplification with Ampli-Taq (Perkin Elmer) was performed using primers for *Mis*, *Oct4* and *Dmrt1* as previously described. The PCR conditions for *Dmrt1* and *Gapdh* were forty cycles of amplification, 45 sec at 95°C, 45 sec at 60°C and 1 min at 72°C. The

PCR conditions for *Mis* and *Oct4* were forty cycles of amplification, 45 sec at 95°C, 45 sec at 68°C and 1 min at 72°C. RT-PCR and PCR were performed on both positive (fluorescent) and negative (non-fluorescent) cells.

RESULTS

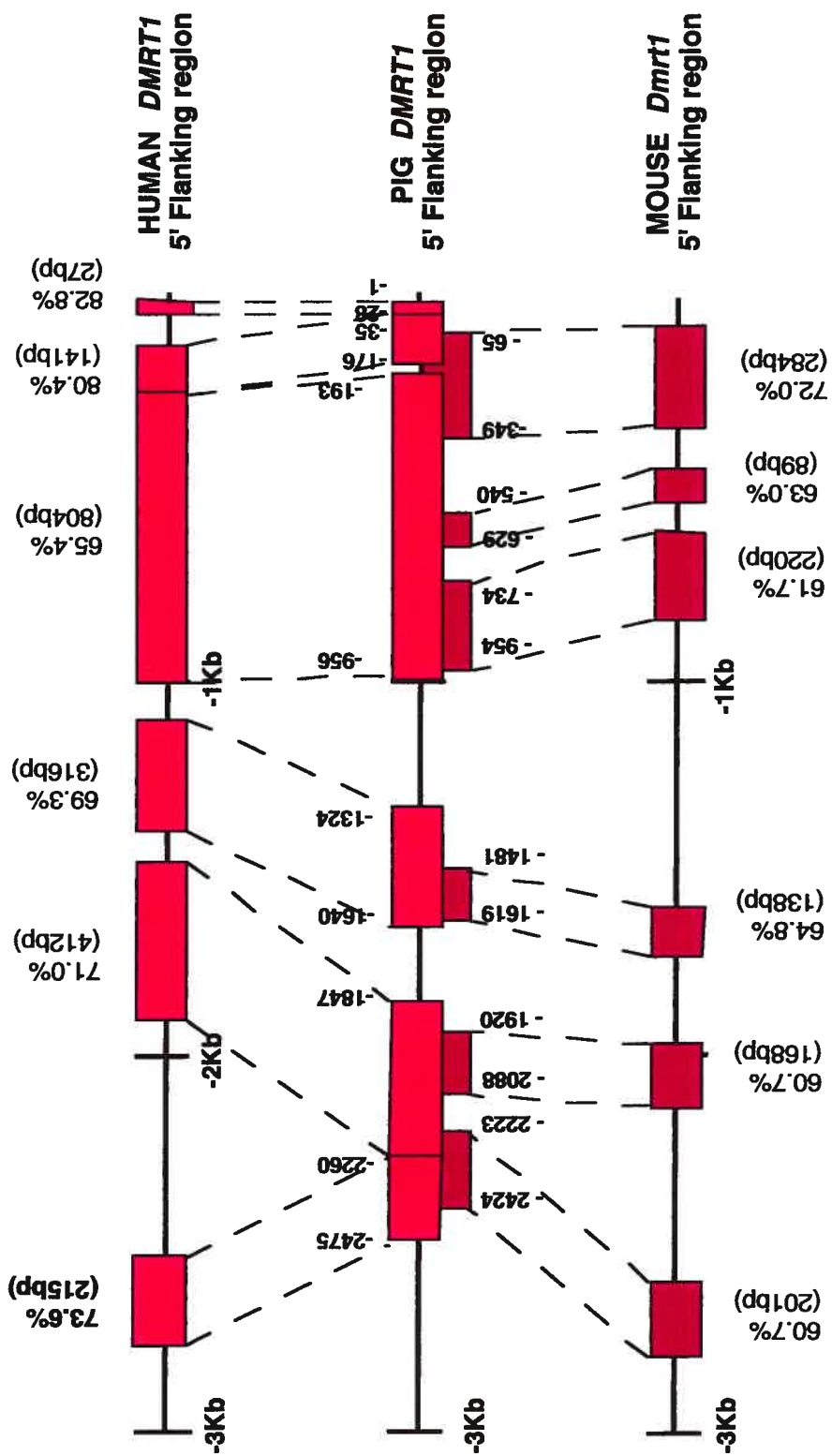
Cloning of the pig *DMRT1* 5' flanking sequences

To obtain pig *DMRT1* promoter sequences, pig *DMRT1* exon 1 coding sequence (Genbank AF216651) was used to screen a commercial pig genomic DNA library in λ phage (Clontech), and 2.6 kb of 5' flanking DNA was generated. Human *DMRT1* 5' flanking sequences were obtained from Genbank (clone RP11-143M15 of chromosomal region 9p23-24.3, accession number AL136365). Mouse *Dmrt1* 5' flanking sequences were communicated by Dr. David Zarkower and are now available at genome.ucsc.edu. Blocks of homology greater than 60% were identified between pig and human sequences, and between pig and mouse sequences. Numerous regions are well conserved between pig *DMRT1* and human *DMRT1* promoter. The same conserved regions can also be seen between pig *DMRT1* and mouse *Dmrt1* 5' flanking regions, but blocks of homology tend to be smaller. Interestingly, insertions and deletions are noticeable when species are compared (Fig. 1), but the order of the homologous sequences is maintained. Recently, *DMRT1* promoter sequences for *Fugu* were described (Brunner et al., 2001), but no notable homologies with human *DMRT1* promoter sequences were identified.

Transgenic mouse production, transgene expression

Transgenic mouse lines containing 2.6 kb of pig *DMRT1* 5' flanking sequences driving green fluorescent protein or Cre recombinase reporter transgenes (pDMRT1p-GFP, pDMRT1p-Cre) were generated via standard pronuclear

Figure 1 Schematic comparison of mouse, human and pig *DMRT1* 5' flanking sequences. Blocks of homology greater than 60% are marked.



microinjection (Hogan et al., 1992). FVB/N female mice were used for embryo collection (Taketo et al., 1991). To aid in visual identification of transgenic animals, a tyrosinase minigene was co-injected with the transgene of interest (Méthot et al., 1995).

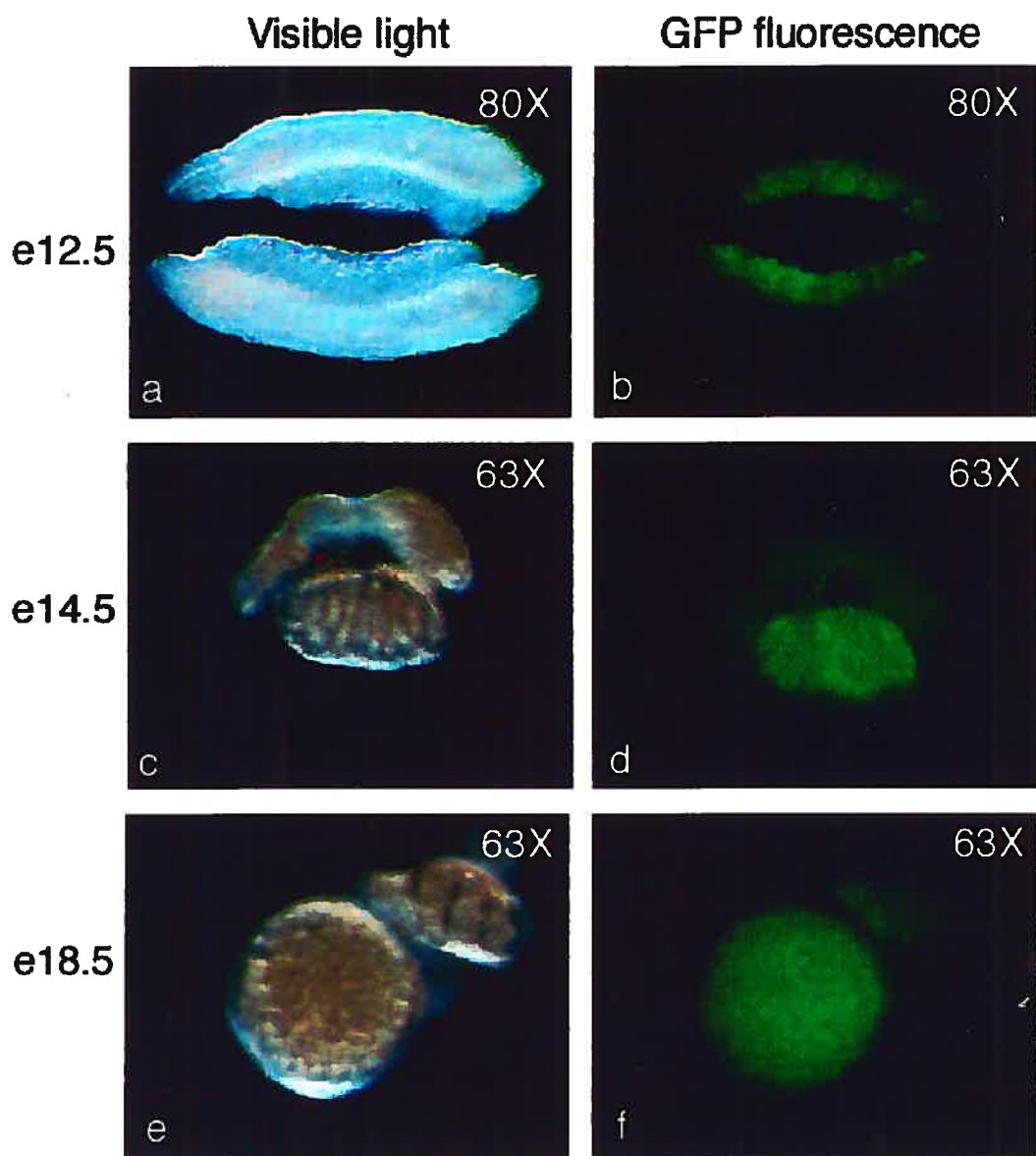
pDMRT1p-GFP

For pDMRT1p-GFP, twelve founder transgenic animals were identified and eleven lines were established. Three lines (9C, 11A, 11B) showed identical genital ridge expression of GFP and were analyzed in detail. Results presented are from heterozygous mice of line 11A. GFP fluorescence was first detected at e11.5 in genital ridges of undifferentiated gonads. At this time, only a few fluorescent cells were observed (data not shown). GFP fluorescence was easily detected just before the formation of testicular cords (at about e12.5 in FVB/N mice) and within testicular cords from late e12.5 to birth of male embryos (Fig. 2). No expression of the transgene outside of the genital ridge was observed. GFP fluorescence was not seen in developing ovaries but expression of the transgene could be detected by RT-PCR at e13.5 to e15.5 but not at e17.5 (Fig. 3).

To identify what cell types expressed the GFP transgene and to determine if the transgene expression recapitulates the expression pattern of the endogenous mouse *Dmrt1*, RT-PCR analysis was performed on FACS purified fluorescent cells taken from testes of e14.5, e17.5 and e19.5 stage embryos. This analysis revealed that the transgene was only expressed in cells expressing the endogenous *Dmrt1* gene for the three stages tested. Furthermore, *Mis* (a marker for Sertoli cells) was strongly expressed in GFP fluorescent cells and was faintly detected in negative cells while *Oct4* (a marker for germinal cells) was expressed by both positive and negative cells, indicating that the transgene was expressed in the majority of Sertoli cells and a proportion of germinal cells (Fig. 4).

Testis of mice heterozygous for the pDMRT1p-GFP transgene were recovered at different ages after birth. The transgene expression was detectable by GFP

Figure 2. Morphology of developing testis expression of GFP from heterozygous embryos of line pDMRT1p-GFP 11A. **(a)** Testis at the very beginning of developing testis cords from e12.5 embryo, 80X magnification. **(b)** Same as in (a) but with fluorescent illumination and GFP filter. **(c)** developing testis from e14.5 embryo, 63X magnification. **(d)** Same as in (c) but with fluorescent illumination and GFP filter. **(e)** Developing testis from e18.5 embryo, 63X magnification. **(f)** Same as in (e) but with fluorescent illumination and GFP filter.



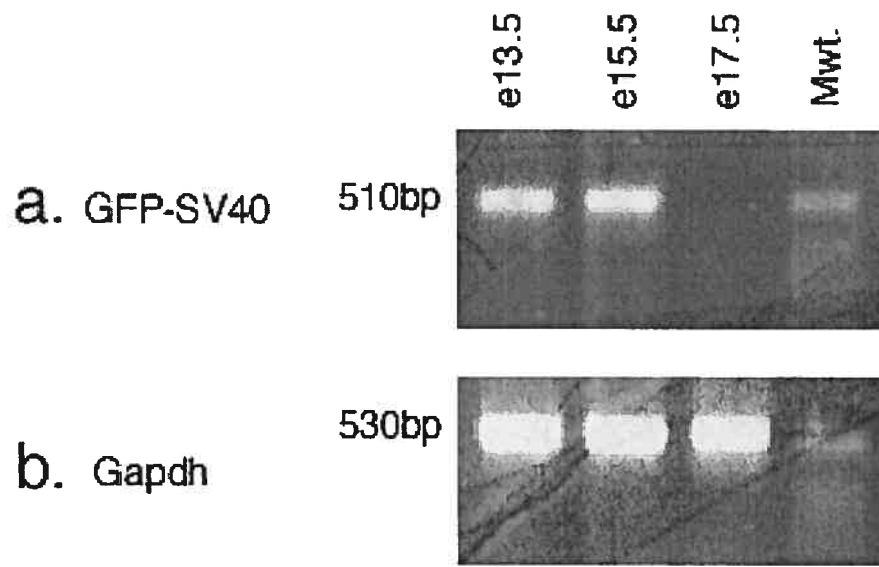


Figure 3: Transgene is expressed at low levels in XX embryos. **a:** RT-PCR analysis for GFP transgene expression, performed on pooled developing ovaries of e13.5, e15.5, e17.5 embryos. **b:** RT-PCR analysis for *Gapdh* expression, performed on the same samples as in (a).

fluorescence from P1 to P21, just before the first wave of spermatogenesis. The pDMRT1p-GFP was not expressed strongly enough to be detected by GFP fluorescence in adult testis of heterozygous mice, but could be detected in adult testis of homozygous mice (data not shown).

pDMRT1p-Cre

For the pDMRT1p-Cre transgene, three founder transgenic animals were identified and two lines were established. Mice positive for pDMRT1p-Cre were crossed with a Cre-reporter mouse line R26R-EYFP, a generous gift from Dr. Frank Constantini, Columbia University. Both lines (1, 2B) showed gonad YFP fluorescence in adult mice when both pDMRT1p-Cre and R26R transgenes were present, and were analyzed in further detail. YFP fluorescence was first detected at e12.0 in genital ridges of undifferentiated gonads (Fig. 5a-d), and was restricted to testicular cords as soon as cords were detectable in developing testis. YFP fluorescence was also detectable in ovaries (Fig. 5e-f). *Cre* expression was also detectable in somites and brain starting at e11.5 in developing embryos (data not shown). In adult double transgenic mice YFP fluorescence was easily detected in both testis and ovaries (Fig. 5g-j) and was slightly visible in the brain (data not shown). To verify if *Cre* was expressed in germ cells, male mice transgenic for both pDMRT1p-Cre and R26R-EYFP were mated to female FVB/N mice. Transgenic embryos from this cross expressed YFP in all tissues with no intermediate patterns of expression detected (Fig. 6).

DISCUSSION

Unlike other developmental systems such as axial skeletal formation and ocular development, the molecular mechanisms pertaining for sex determination and differentiation are not well conserved between the major animal models currently studied. Even within mammals, some genes, such as *SRY* and *DAX1*, show poor

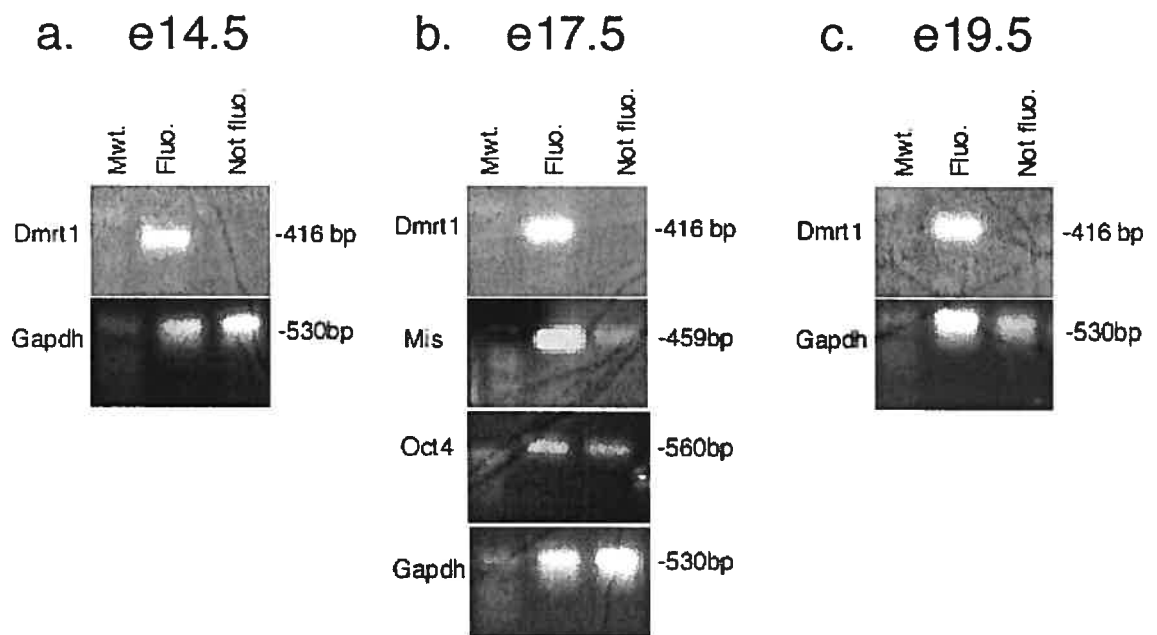
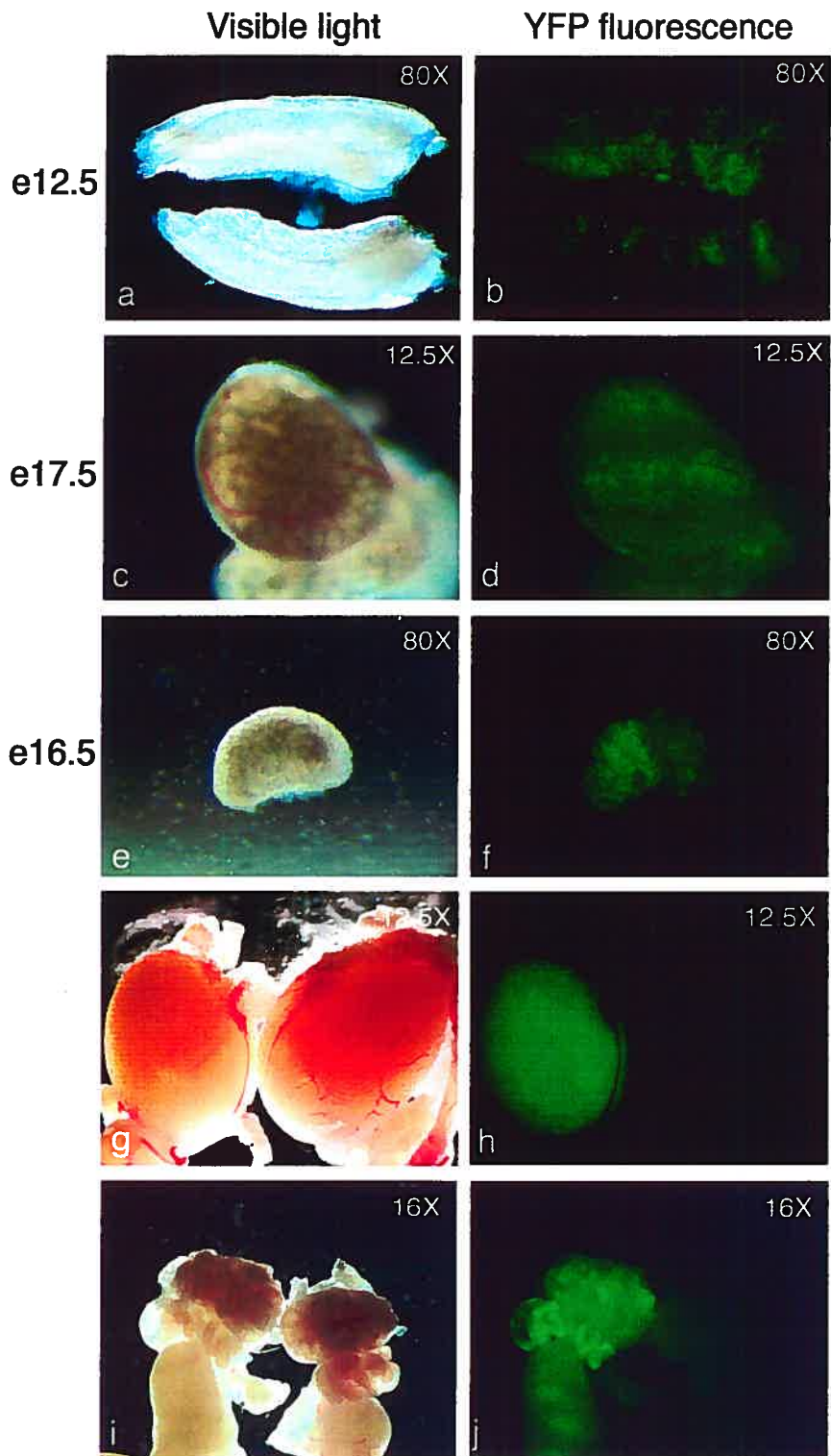


Figure 4. Genotype expression of GFP positive embryonic testis. RT-PCR analysis for *Dmrt1*, *Mis*, *Oct4*, and *Gapdh* performed on fluorescent and non-fluorescent cells of (a) e14.5, (b) e17.5 and (c) e19.5 embryos.

Figure 5. Morphology of developing gonads expressing YFP in heterozygous double transgenic for pDMRT1p-Cre and R26R-EYFP transgenes, in embryo and adults. **(a)** Testis from e12.5 embryo, 80X magnification. **(b)** Same as in (a) but with fluorescent illumination and YFP filter. **(c)** Testis from e17.5 embryo, 12.5X magnification. **(d)** same as in (c) but with fluorescent illumination and YFP filter. **(e)** Ovaries from e16.5 embryo, 80X magnification. **(f)** same as in (e) but with fluorescent illumination and YFP filter. **(g)** Adult testis of double transgenic (left) and FVB/N (right), 12.5X magnification. **(h)** Same as in (g) but with fluorescent illumination and YFP filter. **(i)** Adult ovaries of double transgenic (left) and FVB/N (right), 16X magnification. **(j)** Same as in (i) but with fluorescent illumination and YFP filter.



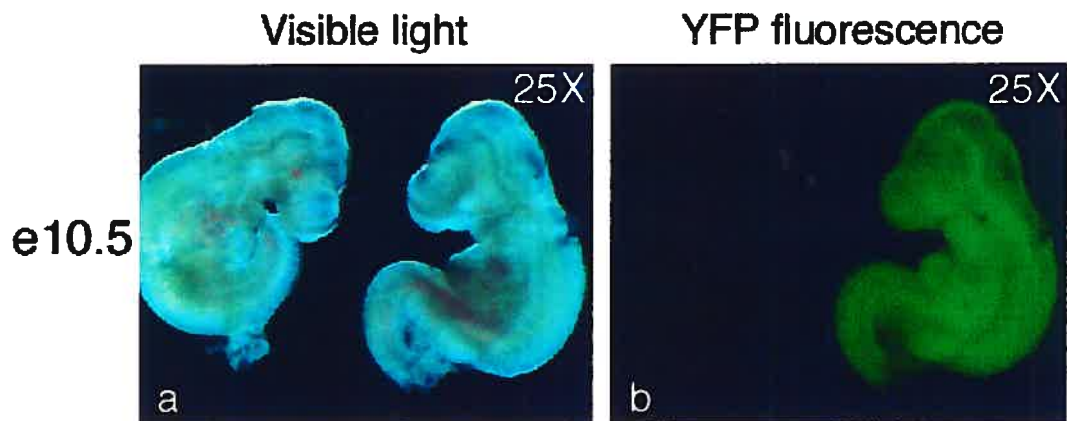


FIGURE 6. Expression of Cre in germ cells. **(a)** e10.5 offspring of mice double transgenic for pDMRT1p-Cre and R26R-EYFP transgenes, crossed with FVB/N. Wild type embryo (left), doubly transgenic embryo (right), 25X magnification. **(b)** Same as in (a) but with fluorescent illumination and YFP filter.

structural conservation (Tucker and Lundrigan 1993; Whitfield et al., 1993), in contrast to other genes such as *SOX9*, *SF1* and *DMRT1*, which are more highly conserved. Additionally, the mouse, the most versatile experimental model for studying mammalian molecular development, often shows the greatest sequence divergence of genes when compared to human and other mammalian species such as the pig. To address these issues and to study the functional conservation of cis-regulatory sequences for mammalian genes involved in sex determination and differentiation, we have developed a heterologous transgenic model system using pig promoter sequences of selected genes to drive the expression of reporter transgenes within the transgenic mouse. Previously, we have exploited this system to identify regulatory functions of the mammalian *SRY* promoter not evident from homologous studies within the mouse (Daneau et al., 2002). We now extend this heterologous *in vivo* model to study the regulation of the mammalian *DMRT1* gene, a gene which shows high structural conservation between mammalian species.

In the present study, we have generated transgenic mice expressing *GFP* under the control of 2.6 kb of pig *DMRT1* 5' flanking DNA sequences. Expression of the transgene is first detected by GFP fluorescence at e11.5 in the genital ridge of undifferentiated gonads. This comes one day after the detection of expression of mouse endogenous *Dmrt1* gene via whole-mount *in situ* hybridization and two days after its detection by RT-PCR (Raymond et al. 1999a). By day e12.5 the GFP fluorescence is associated within testicular cords. The transgene is strongly expressed for the remainder of embryonic development. In developing ovaries fluorescence was not visible although expression of the transgene was easily detected by RT-PCR. Also, YFP fluorescence was detected in the ovaries of mice doubly transgenic for a pDMRT1p-Cre transgene and a R26R-EYFP reporter transgene (Srinivas et al., 2001). Thus the mechanisms regulating *DMRT1* expression within the developing testis appear generally conserved between mammalian species.

To further determine if the pDMRT1p-GFP transgene used in the studies recapitulates the expression of the endogenous mouse *Dmrt1* gene on a cellular basis during sex differentiation, RT-PCR were performed on GFP fluorescent and

non-fluorescent male genital ridge cells purified via FACS. During the three embryonic stages tested (e14.5, e17.5 and e19.5) only GFP fluorescent cells expressed the mouse *Dmrt1* gene, indicating that the transgene is a good marker for cells expressing *Dmrt1* during the period of sex differentiation. It was previously demonstrated that *Dmrt1* mRNA is expressed in both Sertoli and germinal cells (Raymond et al., 1999a). This is also the case for the pDMRT1p-GFP transgene since fluorescent cells expressed *Mis*, a marker of Sertoli cells, and *Oct4*, a marker of germ cells. A faint signal is also detected for *Mis* in non-fluorescent cells. This could reflect the normal expression pattern or turnover rate of *Dmrt1*, whereby most but not all Sertoli cells expressed *Dmrt1* and the pDMRT1p-GFP transgene at a particular time. Alternatively, in a few *Mis* positive cells, expression of GFP could be too low to be detected via GFP fluorescence. The expression of *Oct4* is equally strong in GFP fluorescent and non-fluorescent cells, indicating that not all germ cells express the transgene. It is interesting to note that in mouse embryonic testis, at the protein level, Dmrt1 protein accumulates primarily in Sertoli cell nuclei with little or no expression detectable in germ cells (Raymond et al., 2000). The fact that mouse endogenous *Dmrt1* gene mRNA is not translated in germ cells plus our observation that the *GFP* transgene is expressed only in a percentage of germ cells may indicate that *Dmrt1* doesn't play an active or important role in germ cells at this time of testicular development. The expression of reporter genes under the control of pig *DMRT1* 5' flanking sequences in germ cells is further confirmed by the observation that embryos from a cross between FVB/N mice and mice transgenic for both pDMRT1p-Cre and R26R-EYFP expressed YFP in all tissues.

After birth, the pDMRT1p-GFP transgene remains detectable by GFP fluorescence up to the time of the first wave of spermatogenesis in testis of heterozygous mice (day 21), and is also faintly detected in adult testis of homozygous mice. Mouse *Dmrt1* expression is readily detected in adult testis via northern and *in situ* hybridization, with expression in Sertoli cells in all regions of the seminiferous tubules (Raymond et al., 1999a). *Dmrt1* is also expressed in premeiotic germ cells found early in the spermatogenic cycle (Raymond et al., 2000), although, at present, no studies have quantitatively compared the levels of

Dmrt1 expression in adult and developing testis. In our heterologous transgenic model, GFP fluorescence was readily detected in the developing testes, but was detected only with difficulty within the adult testes. The transgene used in our studies may lack promoter elements necessary to maintain *Dmrt1* expression at a high levels in adult testis. Alternatively these results may simply reflect the relative sensitivity (or lack thereof) of GFP fluorescence for gene expression studies when compared to northern and *in situ* hybridization and especially PCR detection methods.

Recently the rat *DMRT1* promoter was characterized using 5' deletions and transient transfection assays in primary rat Sertoli cells and mouse TM4 cells (Lei and Heckert, 2002). These studies revealed that two distinct regions of the rat *DMRT1* promoter were needed for full function, one located between -3200 bp to -2000 bp (i.e. upstream region) and the other located downstream of -150 bp (i.e. downstream region). The region downstream of -150 bp was studied in detail and it was shown that three sites were protected by *DNase I* footprinting, and furthermore that Sp1, Sp3 and Egr1 bound respectively to these sites. These downstream sites are present within the pig *DMRT1* proximal promoter used in the present studies. The upstream region was less clearly defined, either in terms of function or exact position. Our transgene promoter, at 2.6 kb (which by homology comparison is equivalent to about 2.8 kb of the mouse and human *DMRT1* promoters; see Fig. 1), contains the equivalent of a little over half of this upstream region, including a potential GATA4 binding site at -2260 bp. With the growing recognition of the role of GATA4 in the process of sex determination and differentiation (Tremblay and Viger, 1999, 2001), this site is a candidate for functional studies.

Differences in the expression patterns of *GFP* and *Cre* were observed even if these two reporter transgenes were driven off of the same 2.6 kb of pig 5' *DMRT1* flanking sequences. It is evident that *Cre* is a more sensitive reporter transgene than *GFP*. Once the threshold of enzymatic expression is attained, *Cre* will cause excision of lox sequences in the reporter transgene, ensuring that all daughter cells are fluorescent. Thus it is possible that during development *DMRT1*

is expressed at a very low level and/or transiently in somites and brain, and that this expression has not been detected via traditional detection methods. Interestingly, *Dmrt2* is expressed in somites while *DMRT3* is expressed in the brain (Meng et al., 1999; Ottolenghi et al., 2002). Even with this unanticipated expression in somites and brain, the transgenic line pDMRT1p-Cre should provide a useful tool for generating conditional knock-outs of genes involved not only in sex determination and differentiation but also in gametogenesis in both testis and ovaries.

We showed that mouse genital ridge Sertoli and germinal cells can recognize the pig *DMRT1* promoter sequences and drive the expression of transgenes in a spatio-temporal pattern compatible with endogenous mouse *Dmrt1* expression throughout male sex determination and differentiation. This would indicate that the major regulatory elements for defining this pattern for *DMRT1* expression are conserved within mammalian species, and can be found within the 2.6 kb of 5' flanking region of the pig *DMRT1* promoter used in these studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Diana L. Raiwet for technical assistance and maintenance of mouse lines. Éric Massicotte (IRCM, Montreal) is acknowledged for his help with the FACS purification. Dr. David Zarkower is thanked for providing mouse *Dmrt1* promoter sequences for comparisons. Dr. Dr. Frank Constantini is thanked for providing the Cre-reporter mouse line R26R-EYFP. This work was supported by a fellowship to A. Boyer from the Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and research grants from the National Science and Engineering Research Council (NSERC) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR, formally Medical Research Council of Canada).

REFERENCES

Baker BS, Ridge KA. (1980) Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 94:383-423.

Bennett CP, Docherty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins JR, Grant D. (1993) Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet* 30:518-20.

Brunner B, Hornung U, Shan Z, Nanda I, Kondo M, Zend-Ajusich E, Haaf T, Ropers HH, Shima A, Schmid M, Kalscheuer VM, Scharf M. (2001) Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1. *Genomics* :8-17.

Chen JK, Heckert LL. (2001) Dmrt1 expression is regulated by follicle-stimulating hormone and phorbol esters in postnatal Sertoli cells. *Endocrinology* 142:1167-78.

Crocker M, Coghill SB, Cortinho R. (1988) An unbalanced autosomal translocation (7;9) associated with feminization. *Clin Genet* 34:70-3.

Daneau I, Pilon N, Boyer A, Behdjani R, Overbeek PA, Viger R, Lussier J, Silversides DW. (2002) The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis* 33:170-180.

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* 90:323-6.

Ellegren H. (2001) Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W?. *EMBO Rep* 2:192-6.

Erdman SE, Burtis KC. (1993) The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO J* 12:527-35.

Flejter WL, 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.

Guioli S, Schmitt K, Critcher R, Bouzyk M, Spurr NK, Ogata T, Hoo JJ, Pinsky L, Gimelli G, Pasztor L, Goodfellow PN. (1998) Molecular analysis of 9p deletions associated with XY sex reversal: refining the localization of a sex-determining gene to the tip of the chromosome. *Am J Hum Genet* 63:905-8.

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* 272:662-6.

Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy E. (1994) Manipulating the mouse embryo : A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

Kettlewell JR, Raymond CS, Zarkower D. (2000) Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis* 26:174-8.

Lei N, Heckert L. (2002) Sp1 and Egr1 regulate transcription of the *Dmrt1* gene in Sertoli cells. *Biol Reproduction* 66: 675-84.

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* 1493:180-7.

Methot D, Reudelhuber TL, Silversides DW. (1995) Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 23:4551-6.

Meng A, Moore B, Tang H, Yuang B, Lin S. (1999) A Drosophila doublesex-related gene, terra, is involved in somatogenesis in vertebrates. *Development* 126:1259-1268.

Nanda I, Zend-Ajusch E, Shan Z, Grutzner F, Scharl M, Burt DW, Koehler M, Fowler VM, Goodwin G, Schneider WJ, Mizuno S, Dechant G, Haaf T, Schmid M. (2000) Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet Cell Genet* 89:67-78.

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.

Ottolenghi C, McElreavey K. (2000) Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol Genet Metab* 71:397-404.

Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391:691-5.

Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. (1999a) Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 215:208-20.

Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D. (1999b) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* 8:989-96.

Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 14:2587-95.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

Shen MM, Hodgkin J. (1988) *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell* 54:1019-31.

Smith CA, McClive PJ, Western PS, Reed KJ, Sinclair AH. (1999) Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402:601-2.

Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1:4.

Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, Hansen CT. (1991) FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2065-9.

Tremblay JJ, Viger RS. (2001) GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142:977-86.

Tremblay JJ, Viger RS. (1999) Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol* 13:1388-401.

Tucker PK, Lundrigan BL. (1993) Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. *Nature* 364:715-717.

Veitia RA, Nunes M, Quintana-Murci L, Rappaport R, Thibaud E, Jaubert F, Fellous M, McElreavey K, Goncalves J, Silva M, Rodrigues JC, Caspurro M, Boieiro F, Marques R, Lavinha J. (1998) Swyer syndrome and 46,XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy-9p syndrome. *Am J Hum Genet* 63:901-5.

Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1993) Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature* 364:713-715.

CHAPITRE III

**HUMAN AND PIG *SRY* 5' FLANKING SEQUENCES CAN DIRECT
REPORTER TRANSGENE EXPRESSION TO THE GENITAL RIDGE AND
TO NEURAL CREST CELLS**

ALEXANDRE BOYER, NICOLAS PILON, DIANA RAIWET, JACQUES G.
LUSSIER, AND DAVID W. SILVERSIDES

SOU MIS DEVELOPMENTAL DYNAMICS, AOÛT 2005

**HUMAN AND PIG *SRY* 5' FLANKING SEQUENCES CAN DIRECT
REPORTER TRANSGENE EXPRESSION TO THE GENITAL RIDGE AND
TO NEURAL CREST CELLS**

Alexandre Boyer¹, Nicolas Pilon¹, Diana L. Raiwet¹, Jacques G. Lussier¹,

David W. Silversides^{1*}

¹Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe,
Quebec, Canada.

Short title: *SRY* 5' sequences direct reporter expression to the genital ridge and
neural crest.

Key words: sex determination, human *SRY* promoter, pig *SRY* promoter,
transgenic mice, genital ridge expression, neural crest cell expression.

*Author for correspondence [REDACTED]

ABSTRACT

Mechanisms for sex determination vary greatly between animal groups, and include chromosome dosage and haploid-diploid mechanisms found in insects, temperature and environmental cues found in fish and reptiles, and gene-based mechanisms as seen in birds and mammals. In eutherian mammals, sex determination is genetic, and *SRY* is the Y chromosome located dominant testes determining factor. How *SRY* took over this function from ancestral mechanisms is not known. What is known is that *SRY* is haploid and thus poorly protected from mutations, and consequently is poorly conserved between species. To functionally compare *SRY* promoter sequences we have generated transgenic mice with fluorescent reporter genes under the control of various lengths of human and pig *SRY* 5' flanking sequences. Human *SRY* 5' flanking sequences (5 Kb) supported reporter transgene expression within the genital ridge of male embryos at the time of sex determination, and also supported expression within truncal neural crest cells of both male and female embryos. Pig *SRY* 5' flanking sequences (4.6 Kb) supported reporter transgene expression within the male genital ridge but not within the neural crest; however, 2.6 Kb and 1.6 Kb of pig *SRY* 5' flanking sequences retained male genital ridge expression and now supported extensive expression within cells of the neural crest. When 2 Kb of mouse *SRY* 5' flanking sequences (-3 to -1 Kb) were placed in front of the 1.6 Kb of pig *SRY* 5' flanking sequences and this transgene introduced into mice, reporter transgene expression within the male genital ridge was retained but neural crest expression was lost. Thus we observe that the *SRY* promoter can contain DNA sequences that define neural crest expression patterns, and that these sequences may (as in the pig transgene) or may not (as in the human transgene) be inhibited by additional *SRY* 5' flanking sequences. This suggests a potential evolutionary link between the *SRY* promoter, the developing genital ridge and cells of the neural crest. This further suggests that when *SRY* took over the role of testes determining factor in mammals, it may have done so within the cellular and developmental context of neural crest cells.

INTRODUCTION

The only known developmental role of the mammalian gene *SRY* is that of the testes determining factor (TDF), whose expression within the indifferent genital ridge is sufficient to initiate testes formation (Koopman *et al.*, 1991; Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990). In spite of this fact, the patterns of *SRY* gene expression are variable when compared between mammalian species. In the mouse, expression of *Sry* is first detected in the genital ridge at embryonic day 10.5 (e10.5), peaks at e11.5 (18 tail somites) and is extinguished abruptly at e12.5 (Hacker *et al.*, 1995; Koopman *et al.*, 1990; Bullejos and Koopman, 2001). In the human and additional mammals such as the pig, sheep and dog (Hanley *et al.*, 2000; Daneau *et al.*, 1996; Payen *et al.*, 1996; Meyers-Wallen, 2003) genital ridge *SRY* expression is prolonged during foetal development. RT-PCR analysis of different human foetal and adult tissues have also revealed extra gonadal *SRY* expression although these experiments have not been confirmed by a quantitative technique (Clépet *et al.*, 1993). In addition, marsupial *SRY* is reported to be widely expressed in extragonadal tissues (Foster *et al.*, 1992).

SRY is the founding member of the SOX family of transcription factors, of which there are now at least 30 members (Bowles *et al.*, 2000), and is the sole member of the SOX family group A. It has been suggested from comparative sequence data that *SOX3* (SOX family group B) may be the ancestral precursor of *SRY* (Foster and Graves, 1994; Katoh and Miyata, 1999). *SOX3* is a single-exon gene located on the X chromosome, and in the mouse, *Sox3* is expressed in gonads of both sexes at day e11.5 as well as in the developing nervous system (Collignon *et al.*, 1996; Brunelli *et al.*, 2003). Recently, targeted deletion of *Sox3* in the mouse demonstrated that *Sox3* is not required for overall brain development nor for proper sex determination, although it is needed for normal hypothalamus-pituitary development, tooth development and some functions of somatic and germ cells in the gonads of both sexes (Weiss *et al.*, 2003; Rizzoti *et al.*, 2004).

Little is known about the mechanisms controlling *SRY* expression. To further analyse the pig and human *SRY* promoter in a comparative *in vivo* model, we have generated transgenic mice with fluorescent marker proteins under the control of various lengths of human (5 Kb, 3.3 Kb), pig (4.6 Kb, 2.6 Kb, 1.6 Kb) and hybrid (-3 to -1 Kb mouse, 1.6 Kb pig) *SRY* 5' flanking sequences. The expression patterns observed for these transgenes suggest a link between the *SRY* promoter, cells of the genital ridge and cells of the truncal neural crest.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic Mice

A summary of the transgene constructions used to generate transgenic mice is presented in Fig. 1. The cloning of the 5 Kb and 3.3 Kb of 5' flanking sequences of the human *SRY* promoter was performed by PCR amplification based on publicly available genomic sequences, using the primers 5'-GGATCCTGTCAAAAACAAGGAGAGTGCGAC (antisense strand; underlined *Bam*HI site added to facilitate cloning) with 5'-GAATTCGTGGATGTCATCTGTTTTCTGTTTAC (sense strand; underlined *Eco*RI site added to facilitate cloning) for the 5 Kb fragment, or with 5'-GAATTCTAGTTTGGCAACTTTTGCTGTTGG (sense strand; underlined *Eco*RI site added to facilitate cloning) for the 3.3 Kb fragment. The 5 Kb human *SRY* promoter fragment was ligated into a modified yellow fluorescent protein vector (Clontech), digested with *Eco*RI and *Bam*HI, to produce the hSRYp[5.0 Kb]-YFP transgene. The 3.3 Kb human *SRY* promoter fragment was ligated into a modified DsRED2.1 vector (Clontech), digested with *Eco*RI and *Bam*HI, to produce the hSRYp[3.3 Kb]-RFP transgene.

The cloning of the 4.6 Kb of 5' flanking sequences of the pig *SRY* promoter and the construction of the 4.6 Kb reporter transgene pSRYp[4.6 Kb]-GFP have been previously described (Daneau *et al.*, 2002).

The 2.6 Kb reporter transgene pSRYp[2.6 Kb]-YFP was constructed by digesting pSRYp[4.6 Kb]-GFP with *SacI* plus *HindIII* and ligating the resulting promoter fragment into a modified enhanced YFP reporter sequence (Clontech) also digested with *SacI* plus *HindIII*.

The 1.6 Kb reporter transgene pSRYp[1.6 Kb]-YFP was constructed by PCR amplification of 1.6 Kb of pig 5' flanking sequences using the primers 5'-GGATCCCTCGAGAACAAAATGGTCCCTTTG (sense; underlined *BamHI*) site added to facilitate cloning) and 5'-ACCGGTTTGAAAAGGGGGAGGAAGCGAAAT (antisense; underlined *AgeI* site added to facilitate cloning). The fragment was then ligated in a modified enhanced YFP reporter sequence (Clontech) digested with *BamHI* plus *AgeI*.

The hybrid reporter transgene HybSRYp-RED was constructed by ligating 1.6 Kb porcine *SRY* promoter fragment (previously described) and 2 Kb (from -3 Kb to -1 Kb) of the mouse *Sry* 5' flanking sequences. These mouse sequences were derived by PCR amplification of genomic DNA using the primers 5'-CTGCAGCTTCGTATTTACATTGTCCTTTATCC (sense strand; underlined *PstI* site added to facilitate cloning) and 5'-GGATCCAGGCTGTGTCTCTTTAGTATGCAAAC (antisense strand; underlined *BamHI* site added to facilitate cloning). The mouse fragment was first ligated into the DsRED 2.1 vector (Clontech) with *EcoRI-PstI* adaptors. The pig fragment was then ligated downstream of the mouse fragment after a digestion of the vector with *SacII* and *AgeI*.

All vectors were modified to place *NotI* restriction sites flanking the transgene, to facilitate linearization of the transgene. Transgenic mice were generated via conventional pronuclear microinjection (Nagy *et al.*, 2003), using embryos derived from FVB/N inbred mice (Taketo *et al.*, 1991). To allow visual identification of transgenic animals via pigmentation and to aid in estimating transgene expression, a tyrosinase minigene was coinjected (Méthot *et al.*, 1995). For staging of embryos for dissection trials, noon on the day of vaginal plug detection was designated as embryonic day 0.5 (e0.5). Staging embryos by tail

somites (ts) was as previously described (Hacker *et al.*, 2001), where e11.5 corresponds to about 18 ts, and e12.5 to about 27 ts.

Microscopy and FACS Cell Separation

Embryos from timed matings were dissected and tissues visualized using either a Leica MZ FLIII stereomicroscope with filter sets optimized for GFP, YFP or RFP (Omega Optical) or a Nikon Eclipse C1 E800 microscope with epifluorescence and a Nikon C1-confocal configuration. To isolate fluorescent genital ridge cells, genital ridges were dissected at e12.5 and e14.5 and digested for 30 min at 37°C in M2 media (Sigma) supplemented with collagenase (50 U ml⁻¹) and dispase (2.4 U ml⁻¹) (Boyer *et al.*, 2004). Fluorescent cells were then purified using FACS isolation on a MoFlo cell sorter (FACS Service, IRCM, Montreal, Canada).

PCR Genotyping

Genital ridge cells were taken from e12.5 and e14.5 embryos, FACS purified, and a total of 10,000 fluorescent and non-fluorescent cells recovered for each time point. Messenger RNA was extracted making use of an Oligotex direct mRNA Mini kit (Qiagen), and was incubated with Qiagen RNase free DNase to prevent genomic DNA contamination. Reverse transcription was performed using Superscript II reverse transcriptase (Gibco) and a polydT primer. To detect endogenous expression of mouse *Gapdh*, *Gata4*, *Mis*, *Oct4*, *Sox9* and *Sry*, PCR were performed with Advantage 2 polymerase mix (Clontech) and 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 64°C and 30 sec at 68°C. *Gapdh* primers were designed to amplify a fragment of 530 bp of the mouse cDNA sequence: 5'-AGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA (sense strand) and 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTAGC (antisense strand). Similarly, *Gata4* primers 5'-GTGAGCCTGTATGTAATGCCTGC (sense strand) and 5'-TGATTATGTCCCCATGACTGTCAG (antisense strand) were designed to

amplify a band of 560 bp; *Mis* primers 5'TGGCTAGGGGAGACTGGAGAACAG (sense strand) and 5'-CTGCGGAAAGGCATGGTGTCCA (antisense strand) were designed to amplify a band of 459 pb; *Oct4* primers 5'-GATGGCATACTGTGGACCTCAGGTTG (sense strand) and 5'-CTGATTGGCGATGTGAGTGATCTGC (antisense strand) were designed to amplify a band of 560 bp; *Sox9* primers 5'-GACGTGCAAGCTGGCAAAGTTGA (sense strand) and 5'-TGCTGCTTCGACATCCACACGTG (antisense strand) were designed to amplify a band of 289 bp; and *Sry* primers 5'-CATGGAGGGCCATGTCAAGCG (sense strand) and 5'-TGTTGAGGCAACTGCAGGCTGT (antisense strand) were designed to amplify a band of 290 bp. Amplified bands were size fractionated on a 1% agarose gel.

RESULTS

Transgenic Mouse Production

Transgenic mouse lines containing 5 Kb (hSRYp[5.0 Kb]-YFP) and 3.3 kb (hSRYp[3.3 Kb]-RFP) of human *SRY* 5' flanking sequences or 4.6 Kb (pSRYp[4.6 Kb]-GFP), 2.6 Kb (pSRYp[2.6 Kb]-YFP) and 1.6 Kb (pSRY[1.6 Kb]-YFP) of pig *SRY* 5' flanking sequences or a hybrid sequence of 2 Kb of mouse 5' *Sry* flanking sequences and 1.6 Kb of pig *SRY* 5' (HybSRYp-RFP) flanking sequences driving green, yellow or red fluorescent protein reporter transgenes were generated via standard pronuclear microinjection. In general, observations of at least two independently derived lines were performed.

Genital Ridge Transgene Expression

For the hSRYp[5.0 Kb]-YFP lines, YFP fluorescence was first detected at e11.5 to e12.0 (corresponding to ts 19) in genital ridges of undifferentiated gonads

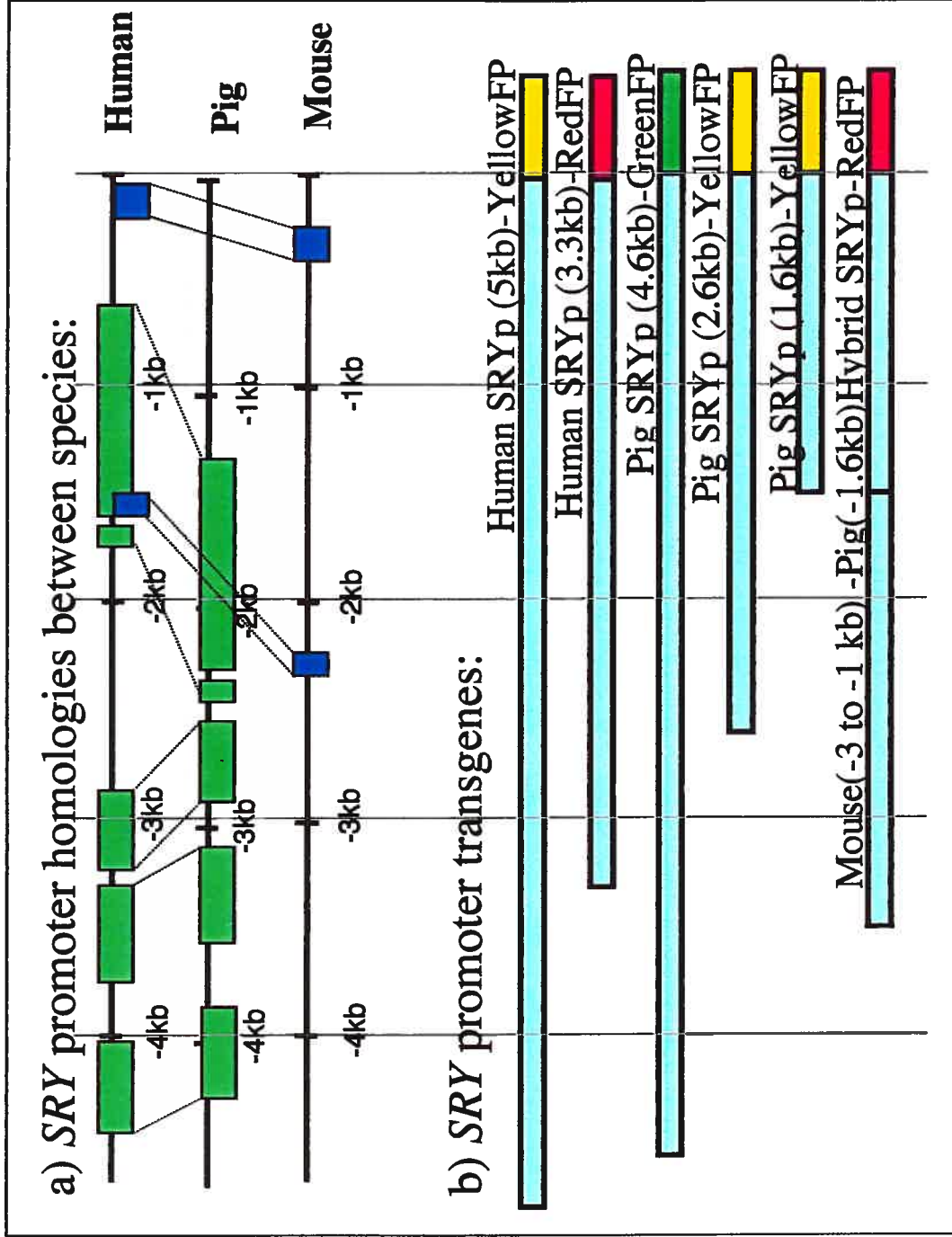


Figure 1 SRY promoter-fluorescent reporter transgene. a) Schematic comparison of mouse, human and pig SRY 5' flanking sequences. b) Transgenes used to generate the transgenic mice described in this report.

of male embryos with expression remaining high throughout embryonic development and within newborn and adult testes (Fig. 2). No fluorescence was observed in the female genital ridge but expression of the transgene could be detected by RT-PCR performed on e11.5 XX genital ridges (data not shown). To identify which cell types expressed the YFP transgene, RT-PCR analysis was performed on FACS-purified fluorescent genital ridge cells taken from testes of e12.5 and e14.5 stage embryos. This analysis revealed the presence of endogenous *Sry* transcripts within the e12.5 fluorescent cells but no expression of the *Oct4* transcript; alternatively, non fluorescent cells showed the presence of *Oct4* transcripts but not *Sry* transcripts (Fig. 3). RT-PCR performed on e14.5 fluorescent cells confirmed *Gata4*, *Mis*, and *Sox9* expression but not *Oct4* expression, consistent with the fluorescent cells being of pre-Sertoli cell lineage and not of germ cell lineage; non fluorescent cells included germ cells as revealed by the expression of *Oct4* expression.

The hSRYp[5.0 Kb]-YFP line was mated to the HybSRYp-RFP line and confocal microscopy studies of double transgenic embryos revealed that within the genital ridge at e13.5, the cells that expressed yellow fluorescence also expressed red fluorescence; i.e. the two transgenes were marking the same cell populations (Fig. 4). In comparison, when the HybSRYp-RFP transgene was co-expressed with an Oct4-GFP transgene (Anderson *et al.*, 2000), which labels germ cells with GFP, two distinct cell populations (pre-Sertoli cells in red, germ cells in green) are discernable.

For the hSRYp[3.3 Kb]-RFP transgene, none of the three positive lines obtained showed visible genital ridge expression of RFP at any moment of gonadal development or in adulthood, although they did display transgene expression within extragonadal tissues.

For the pSRYp[2.6 Kb]-YFP, pSRYp[1.6 Kb]-YFP and HybSRYp-RFP transgenic lines, genital ridge fluorescence was first detected at e11.5 to e12.0 in the undifferentiated gonads of male embryos with expression remaining detectable throughout embryonic development and into adulthood. For the pSRYp[1.6 Kb]-YFP transgene, fluorescence was readily evident within the newborn and adult

Figure 2. Human and pig *SRY* 5' flanking sequences will support fluorescent marker transgene expression in the genital ridge at e12.5 as well as in newborn and adult testes. (a) Male and female genital ridges from mice transgenic for the human *SRYp[5 Kb]-YFP* transgene at 100x magnification with visible light. Testis is labeled te; ovary is labeled ov. (b) Same tissues as in (a) with fluorescence illumination and YFP filters. (c) Newborn testis from a mouse transgenic for the human *SRYp[5 Kb]-YFP* transgene at 63x magnification with visible light. (d) Same tissues as in (c) with fluorescence illumination and YFP filters. (e) Confocal image of a seminiferous tubule taken from an adult mouse transgenic for the human *SRYp[5 Kb]-YFP* transgene at 400x magnification, merged visible light and YFP fluorescence. (f) Male and female genital ridges from mice transgenic for the pig *SRYp[1.6 Kb]-YFP* transgene at 80x magnification with visible light. Testis is labeled te; ovary is labeled ov. (g) Same tissues as in (f) with fluorescence illumination and YFP filters. (h) Newborn testis from a mouse transgenic for the pig *SRYp[1.6 Kb]-YFP* transgene at 63x magnification with visible light. (i) Same tissues as in (h) with fluorescence illumination and YFP filters. (j) Confocal image of a seminiferous tubule taken from an adult mouse transgenic for the pig *SRYp[1.6 Kb]-YFP* transgene at 400x magnification, merged visible light and YFP fluorescence.

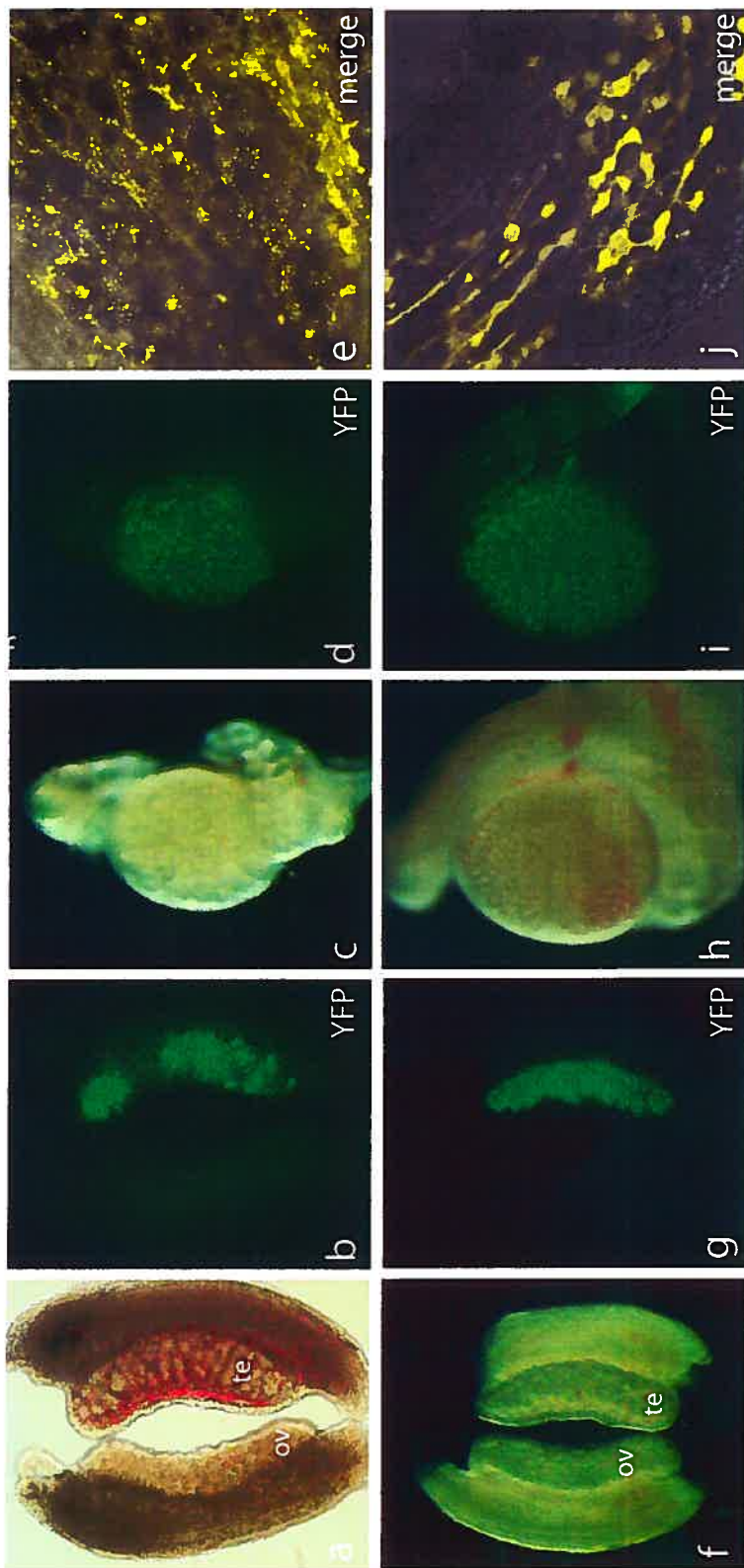


Figure 3. Human *SRY* 5' flanking sequences (5 Kb) support reporter transgene expression within pre-Sertoli cells of the male genital ridge. Fluorescently labeled (Fluo+) or unlabelled (Fluo-) cells from the male genital ridge of hSRYP[5 Kb]-YFP embryos were separated by FACS and subjected to RT-PCR expression analysis. Molecular weight marker is 1 Kb ladder (Gibco); 500 bp band is marked with an asterisk (*). *Oct4* amplified sequences within non-fluorescent cell populations give a band at 560 bp. *Gapdh* amplified sequences, as an internal control for RNA recovery, reverse transcription, and PCR amplifications, give a band at 530 bp within both fluorescent and non-fluorescent cell populations. (a) e12.5 embryos. *Sry* amplified sequences within the fluorescent cell population give a band at 289 bp. (b) e14.5 embryos. *Sox9*, *Gata4* and *Mis* amplified sequences within the fluorescent cell population give bands at 290 bp, 456 bp and 459 bp, respectively.

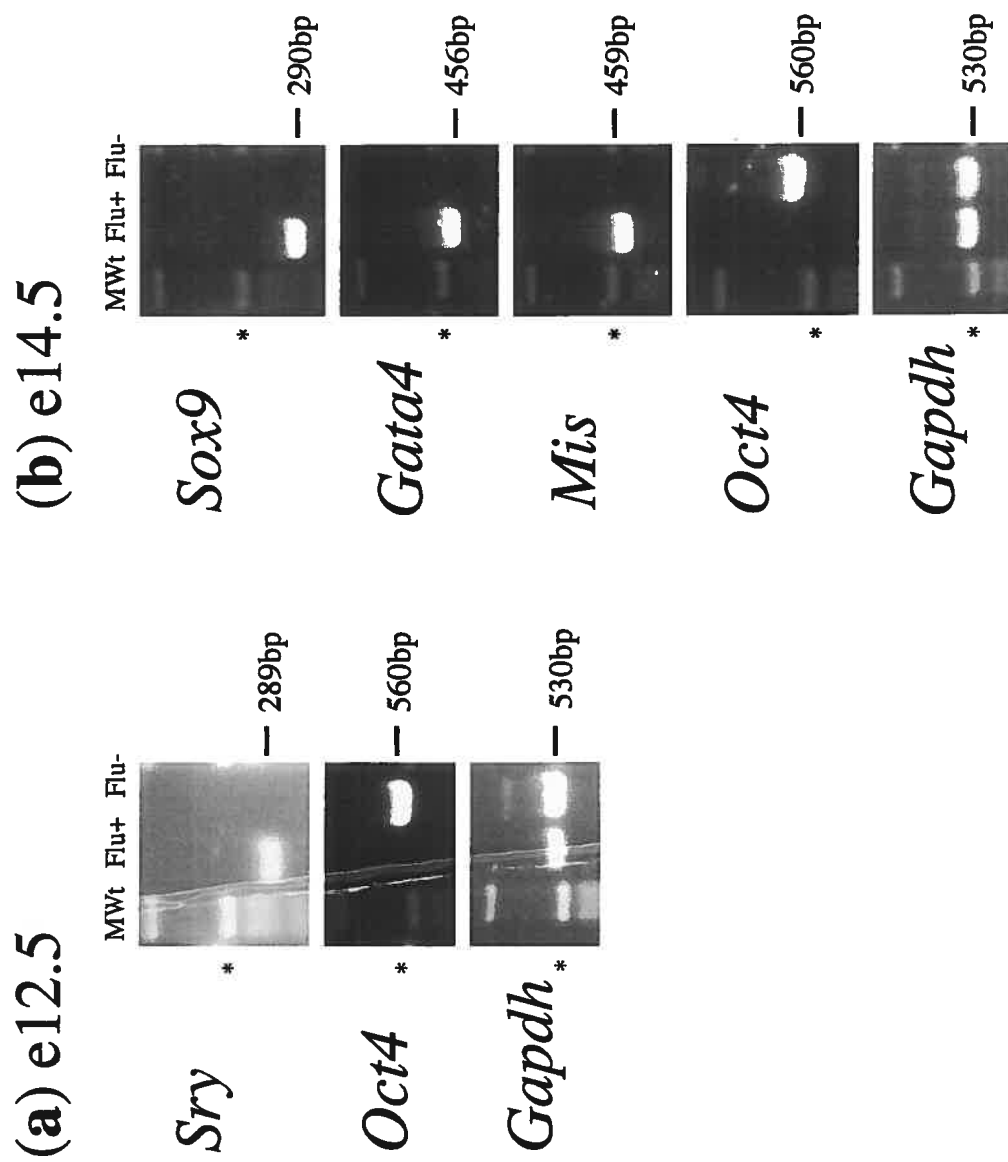
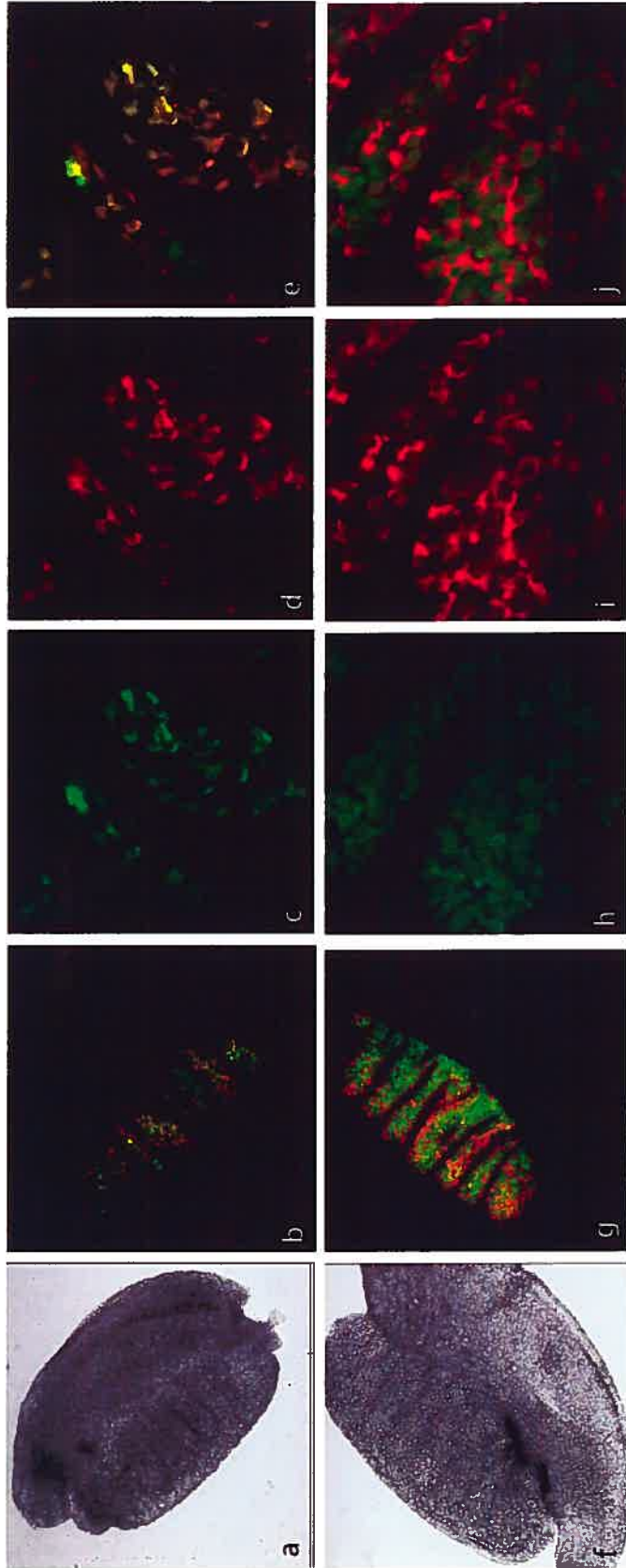


Figure 4. Double transgenic marking shows that different *SRY* 5' flanking transgenes will co-mark the pre-Sertoli cell population within the male genital ridge, while this population is distinct from the germ cell population. Images (a-e) are from hSRYp[5 Kb]-YFP and HybSRYp-RFP double transgenic male gonads, age e13.5. (a) visible light at 100x magnification. (b) Confocal image of sample in (a), with merged GFP-YFP plus RFP channels. (c) Confocal image taken from sample in (a) with GFP-YFP channel, at 400x magnification. (d) Confocal image as in (c), with RFP channel. (e) Confocal image as in (c), with merged GFP-YFP and RFP channels. In comparison, images (f-j) show separate marking of pre-Sertoli cells and germ cells, based on HybSRYp-RFP and Oct4-GFP double transgenic male gonads, age e13.5. (f) visible light at 100x magnification. (g) Confocal image taken from sample in (f) with merged GFP-YFP and RFP channels. (h) Confocal image taken from sample in (f) with GFP-YFP channel, at 400x magnification. (i) Confocal image as in (h), with RFP channel. (j) Confocal image as in (h) with merged GFP-YFP and RFP channels.



testes (Fig. 2). For this transgene, fluorescence was also observed within the female genital ridge at e12.5 where expression was approximately fifty times weaker than that seen in the male.

Neural Crest Transgene Expression

In addition to expression within the genital ridge, expression of the transgene from selected *SRY* promoter transgenic lines was also detected within neural crest cells of both sexes. For the hSRYp[5.0 Kb]-YFP transgene, expression was seen within the head and in the trunk by day e10.5. By day e11.5, expression was in the dorsal and ventral ganglia of the trunk, in migrating peripheral nerve tracts, within the gastric trunk and around the aorta. Expression was notably detected in a segmented pattern on each side of the neural tube, typical of neural crest cell migration (Fig. 5). By day e13.5, fluorescence expression was also visible in melanoblasts. By day e14.5, expression of the transgene was weaker within truncal neural crest cells following a ventral to caudal wave, and became undetectable shortly thereafter.

For the hSRYp[3.3 Kb]-RFP transgene, fluorescence was again detected within truncal neural crest cells although expression appeared later (e13.5) and was not as comprehensive when compared to the hSRYp[5.0 Kb]-YFP transgene (Fig. 5).

For the pSRYp[2.6 Kb]-YFP and pSRYp[1.6 Kb]-YFP transgenic lines, expression of fluorescence recapitulated the entire pattern of neural crest cell migration (Figs. 6, 7). By day e11.5, expression was seen within cranial neurons, in brachial arches, in the dorsal and ventral ganglia of the trunk and in melanoblasts. As seen for the human *SRY* promoter transgenes, expression disappeared in neural crest cells in a ventral to caudal wave by about day e15.5, with the exception of peripheral neurons.

Transgene expression was not detected in migrating neural crest cells for the pSRYp[4.6 Kb]-YFP nor for the HybSRYp-RED transgenic lines (Fig. 7). A

Figure 5. Comparison of fluorescent marker expression in embryos from human *SRY* promoter fluorescent marker mouse lines hSRYP[5 Kb]-YFP and hSRYP[3.6 Kb]-RFP. (a) hSRYP[5 Kb]-YFP whole embryo e11.5 20x, visible light. (b) same as in (a) but with yellow fluorescence filters. (c) hSRYP[5 Kb]-YFP embryo, dorsal view e11.5, 32x visible light. (d) same as in (c) but with yellow fluorescence filters. (e) hSRYP[5 Kb]-YFP embryo, abdominal cavity e13.5, 32x visible light. (f) same as in (e) but with yellow fluorescence filters. (g) hSRYP[3.6 Kb]-RFP embryo, dorsal view e13.5, 20x visible light. (h) same as in (g) but with red fluorescence filters.

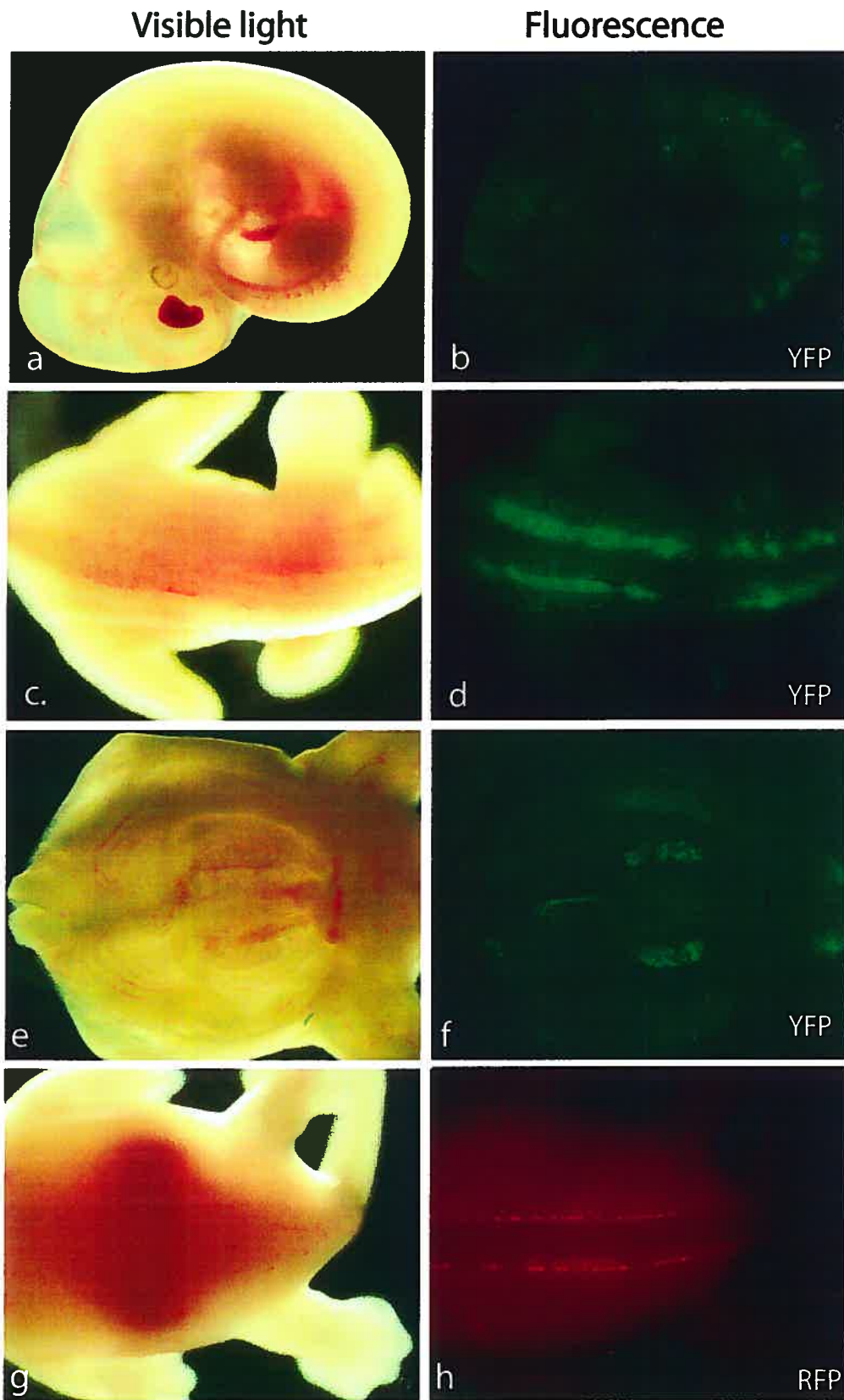


Figure 6. Neural crest expression of reporter transgenes in embryos from pig *SRY* promoter fluorescent marker mouse lines. **(a)** pSRYp[2.6 Kb]-YFP, whole embryo e12.5, 10x, visible light. **(b)** same as in (a) but with yellow fluorescence filters. **(c)** pSRYp[2.6 Kb]-YFP embryo, dorsal view, e12.5, 25x, visible light. **(d)** same as in (c) but with yellow fluorescence filters. **(e)** pSRYp[1.6 Kb]-YFP whole embryo, e12.5, 12.5x, visible light. **(f)** same as in (e) but with yellow fluorescence filters. **(g)** pSRYp[1.6 Kb]-YFP embryo, dorsal view, e12.5, 25x, visible light. **(h)** same as in (g) but with yellow fluorescence filters.

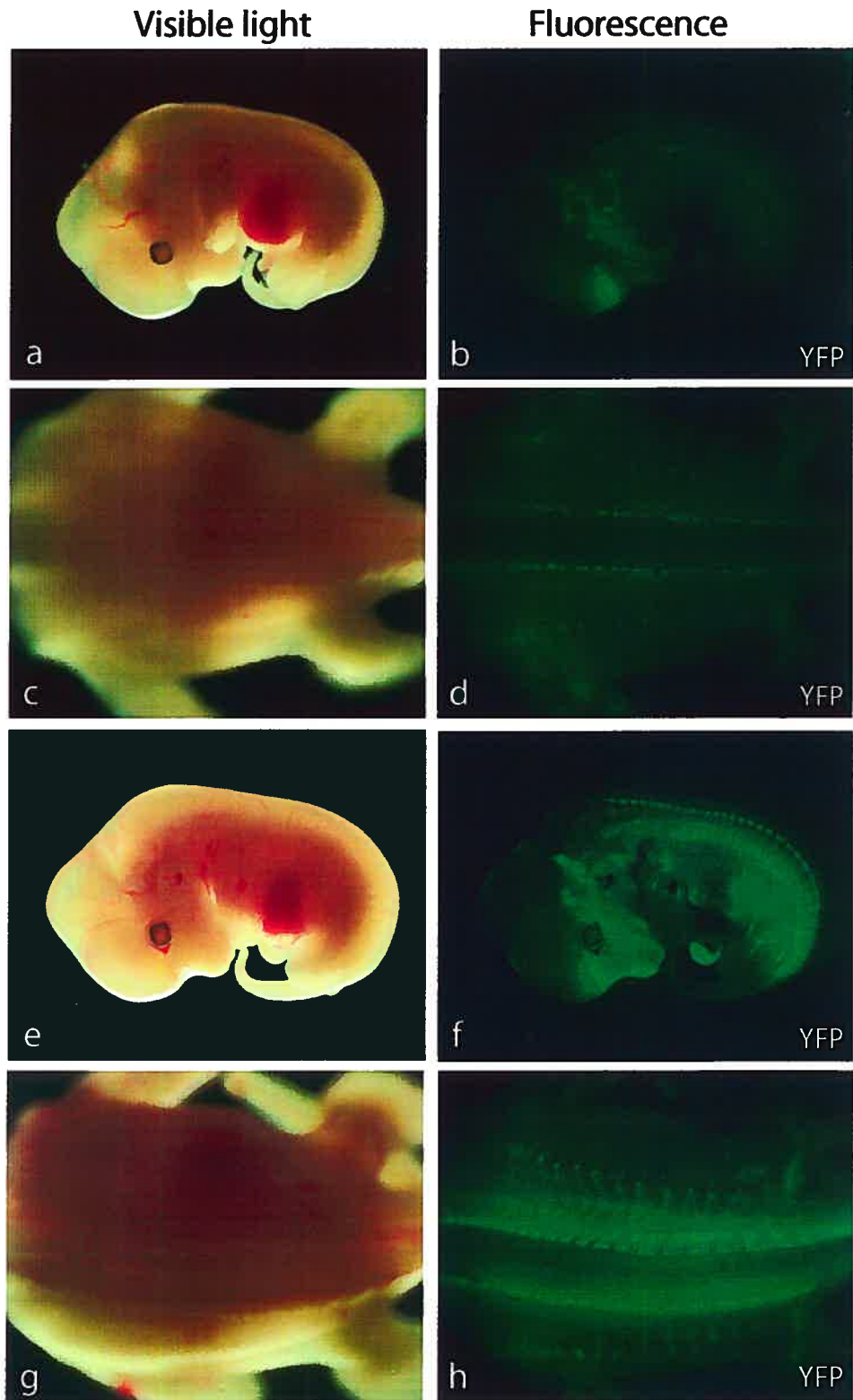
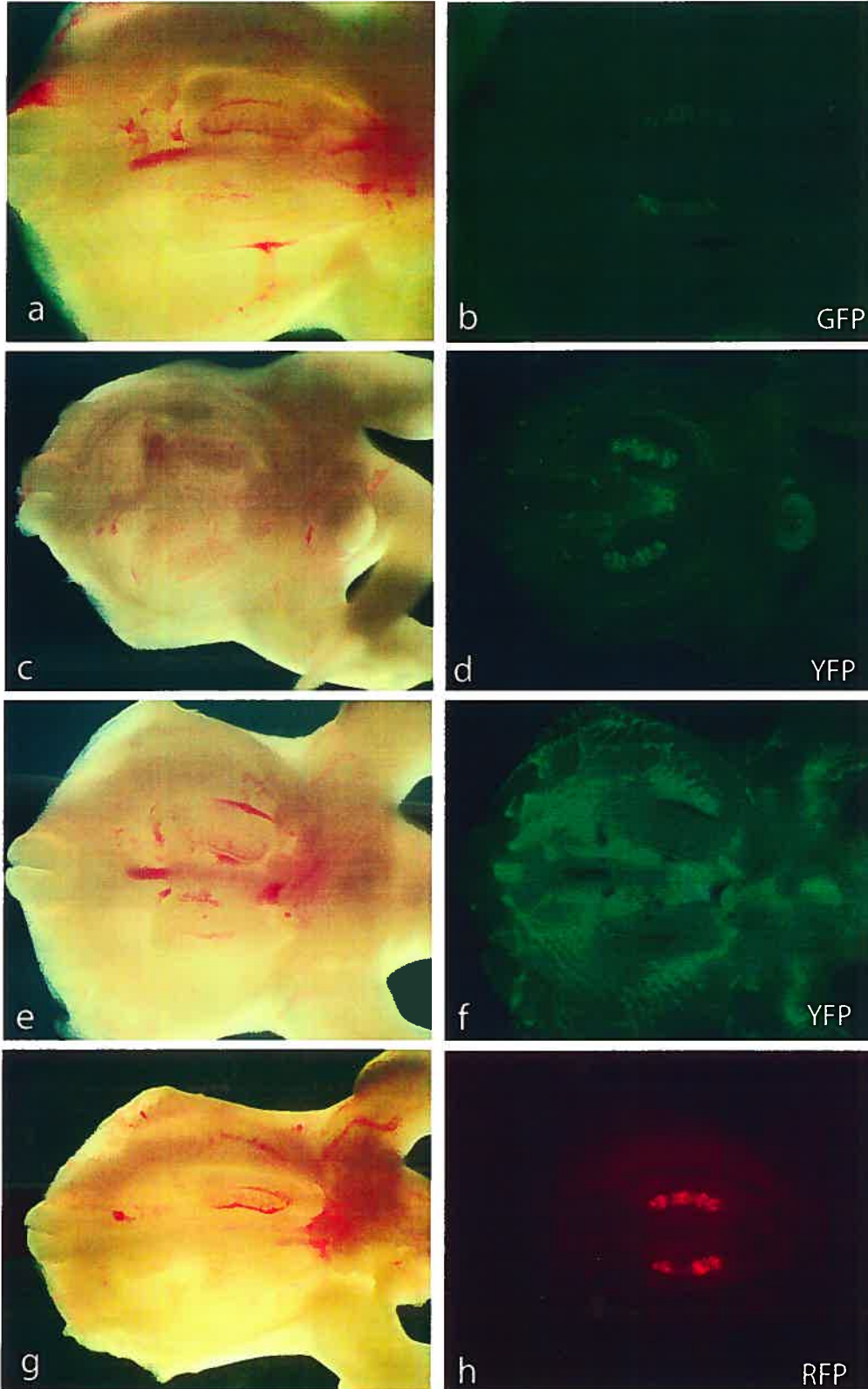


Figure 7. Comparison of fluorescent marker expression within the abdominal cavity of embryos from pig *SRY* promoter fluorescent marker mouse lines. **(a)** pSRYp[4.6 Kb]-GFP, e12.5, 40x, visible light. **(b)** same as in (a) but with green fluorescence filters. **(c)** pSRYp[2.6 Kb]-YFP, e13.5, 25x, visible light. **(d)** same as in (c) but with yellow fluorescence filters. **(e)** pSRYp[1.6 Kb]-YFP, e12.5, 32x, visible light. **(f)** same as in (e) but with yellow fluorescence filters. **(g)** HybSRYp-RFP, e12.5 (mouse and pig fusion promoter; see text), 20x, visible light. **(h)** same as in (g) but with red fluorescence filters.

Visible light

Fluorescence



summary of genital ridge and neural crest expression patterns for the different *SRY* promoter transgenic lines used in these studies is presented in Table 1.

DISCUSSION

Since the cloning of *SRY* in human and mouse and its identification as the mammalian testes determining factor, numerous additional genes have been identified in the process leading to and following sex determination. Unfortunately our understanding of the molecular mechanisms of how *SRY* accomplishes its pivotal role in mammalian sex determination remains unsatisfactory.

SRY is unique to mammals but not all mammals have *SRY*. Since *SRY* sequences are present in eutherian and metatherian (marsupial) species but are absent in protherian (monotreme) species, it is suggested either that *SRY* was present in the prototype mammalian genome, dated at about 165 million years (Mys) from present, and was subsequently lost in the monotreme lineage, or that *SRY* did not appear until just prior to the metatherian-eutherian divergence, at 130 Mys from present (Marshall Graves, 2002a). What is known is that *SRY* sequences are highly variable (i.e. poorly conserved) between mammalian species, both within open reading sequences (Whitfield *et al.*, 1993; Tucker and Lundrigan, 1993) and within promoter sequences (Margarit *et al.*, 1998; Pilon *et al.*, 2003). The location of *SRY* on the Y chromosome would be a contributing factor to this high rate of mutation as genes on the Y chromosome are subject to accelerated rates of degradation and loss (Marshall Graves, 2002b). Indeed, several rodent species appear to have already lost *SRY* sequences, with sex determination occurring by an alternative (and presently undefined) mechanism (Just *et al.*, 1995).

In recent years whole genomes have become available for analysis, including the human, mouse, and rat and now the dog and bovine genomes. Comparisons of the neutral substitution rate (i.e. general mutation rate per unit time) between human and mouse genomes suggests that the mouse genome is subject to a mutation rate that is on average 2x higher than that seen in the human genome, and

Source of <i>SRY</i> promoter sequences:	Transgenic mouse line	# lines	<u>Transgene expression:</u>	
			Genital ridge	Neural crest
Human	hSRYp[5.0 Kb]-YFP	3	+	+
Human	hSRYp[3.3 Kb]-RFP	3	-	+
Pig	pSRYp[4.6 Kb]-GFP	3	+	-
Pig	pSRYp[2.6 Kb]-YFP	3	+	+
Pig	pSRYp[1.6 Kb]-YFP	2	+	+
Hybrid (mouse, pig)	HybSRYp-RFP	3	+	-

Table 1: Summary of genital ridge and/or neural crest expression of *SRY* promoter-fluorescent marker transgenic mouse lines.

currently may be as much as 5x higher (Waterston *et al.*, 2002). A much shorter generation time in the mouse is felt to be at least partly responsible for this difference. In contrast, the neutral substitution rate within the dog genome is equivalent to that seen in humans (Kirkness *et al.*, 2003). When synonymous and nonsynonymous substitutions within coding sequences are compared, mouse sequences are found to be more divergent from dog and from human sequences than are dog and human sequences from each other. At the level of chromosome structure, human and pig share 47 contigs, human and dog share 85 contigs, while human and mouse share up to 180 contigs (O'Brian *et al.*, 1999).

Taking into consideration general mutation rate, chromosomal rearrangements and generation time, it can be argued that in general, mouse DNA sequences are more distanced from the original mammalian genome than DNA sequences of larger mammals including human, dog and pig. This would be particularly true for DNA sequences found on the Y chromosome. Applying this same logic to *SRY* sequences, it can now be argued that mouse *Sry* sequences are more distanced evolutionarily from the original mammalian *SRY* sequences than are human and pig *SRY* sequences. Conversely stated, present day human (and pig) *SRY* sequences are closer to the original *SRY* prototype sequences than are present day mouse *Sry* sequences. If this statement is accepted as plausible, then our experimental model involving cross species *SRY* promoters within the transgenic mouse can be interpreted from an evolutionary point of view, as a reflection of how the prototypical mammalian *SRY* promoter may have functioned at some point in the past, or as the present day *SRY* promoter may still function in species less amenable to experimental manipulation than the mouse.

Two caveats to our experimental model must be kept in mind. Firstly, the transcriptional machinery of the mouse must be sufficiently conserved to be able to recognise the human and pig *SRY* promoter sequences with biological fidelity. Secondly, sufficient promoter sequences must be used to derive meaningful results.

In a first series of observations from our transgenic mouse models, human and pig *SRY* promoter transgenes consistently directed reporter protein expression to the male genital ridge at the time of sex determination. The only exception was

the hSRYp[3.3 Kb]-RFP transgene, where in three independently derived lines, transgene expression was seen within dorsal ganglia but was not seen within the male genital ridge. These observations would argue that for the human *SRY* promoter, sequences between 3.3 Kb and 5.0 Kb upstream of the translational start site are required for genital ridge expression *in vivo*. Currently, *in vitro* studies of the human *SRY* promoter have been limited to the first 1 kb in front of the translational start site (Desclozeaux *et al.*, 1998; DeSanta Barbara *et al.*, 2001; Hossain and Saunders, 2001).

The onset of genital ridge marker protein expression seen in our models was consistent although slightly delayed with what has been described for endogenous mouse *Sry* expression (Bullejos *et al.*, 2001; Sekido *et al.*, 2004). In lines with strong transgene expression, fluorescence could be briefly detected within the female genital ridge at about e12.5 although at a much reduced level compared to the male genital ridge; this is not inconsistent with previously described transgenic reporter models using the mouse *Sry* promoter (Albrecht and Eicher, 2001). The genital ridge expression of the reporter *SRY* transgenes in our models consistently follows the human (pig, sheep, dog) pattern of extended *SRY* expression (Daneau *et al.*, 1996; Hanley *et al.*, 2000; Payen *et al.*, 1996; Parma *et al.*, 1999; Meyers-Wallen, 2003), rather than the mouse pattern of abruptly terminated *Sry* expression (Hacker *et al.*, 1995). Indeed, for both human and pig *SRY* promoter sequences (hSRYp[5.0 kb]-YFP, pSRYp[2.6 Kb]-YFP and pSRYp[1.6 Kb]-YFP), transgene expression was readily detectable in newborn as well as adult testes (shown in Fig. 2).

That fluorescently marked genital ridge cells seen in male embryos for the hSRYp[5.0 Kb]-YFP line were indeed pre-Sertoli cells was shown by gene expression studies performed on purified fluorescent cells at e12.5 and e14.5. Fluorescently positive cells clearly express endogenous mouse markers for pre-Sertoli cells including *Sry*, *Sox9*, *Mis* and *Gata4* (Fig. 3). Confocal microscope studies of double transgenic embryos confirmed that the same population of male genital ridge cells was marked by different *SRY* promoter transgenes (Fig. 4).

In a second series of observations from our transgenic mouse models, human and pig *SRY* promoters were able to direct reporter transgene expression to cells of the neural crest in both male and female embryos. For the human *SRY* promoter sequences, the 5 Kb transgene was more efficient in generating neural crest expression than 3.3 Kb transgene. For the pig *SRY* promoter sequences, 4.6 Kb did not result in visually detectable expression within cells of the neural crest, although extragonadal transgene expression was seen in the limb and tail buds and the sex tubercle of both sexes. In contrast, 2.6 Kb and 1.6 Kb of pig *SRY* promoter sequences consistently and dramatically resulted in neural crest cell expression of reporter transgenes in both male and female embryos, suggesting that information defining neural crest cell expression is inherent to these sequences. This neural crest expression can be inhibited, either by upstream sequences (-4.6 to -2.6 Kb) of the pig *SRY* promoter, or by upstream sequences (-3.0 to -1.0 Kb) of the mouse *Sry* promoter, without affecting genital ridge expression.

Taken together, these data suggest that the *SRY* promoter not only contains sequences for directing expression to the genital ridge at the time of sex determination, but from at least two mammalian species (human, pig) can also contain sequences for directing expression to cells of the truncal neural crest. This neural crest expression pattern may or may not be inhibited, depending on the species. For the human *SRY* promoter, the capacity for neural crest expression is inherent within a 5 Kb fragment; whether or not longer fragments will maintain or inhibit this pattern of expression must be addressed experimentally. For the pig *SRY* promoter, the neural crest expression pattern is revealed with shorter promoter sequences (2.6 Kb and 1.6 Kb), but can be inhibited by additional *SRY* promoter sequences from either the pig or from the mouse.

These observations are compatible with the theory that sequences that became *SRY* were originally derived from a gene expressed within the developing nervous system that expanded its expression pattern to include cells of the genital ridge at the time of sex determination (Marshall Graves, 2002b). This original expression pattern could have included cells of the peripheral nervous system, i.e. cells of the neural crest. Since this origin and depending on the species, *SRY*

sequence and expression patterns will have diverged to a greater or lesser extent from original patterns. Species such as the human and pig may retain echoes of a neural crest cell origin of *SRY* expression, both in promoter sequences and possibly in cell expression patterns. For species such as the mouse, *Sry* sequences may have degraded to the point that promoter sequences and expression patterns no longer reflect this origin.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Celine Forget for technical assistance, transgene construction and embryo microinjection. Éric Massicotte and Martine Dupuis (IRCM, Montreal) are acknowledged for their help with the FACS purification. This work was supported by a fellowship to A. Boyer from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and research grants from the National Science and Engineering Research Council (NSERC) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR, formally Medical Research Council of Canada).

REFERENCES

Albrecht KH, Eicher EM. (2001) Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol.* 240(1):92-107.

Anderson R, Copeland TK, Scholer H, Heasman J, Wylie C. (2000) The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev.* 91(1-2):61-8.

Bowles J, Schepers G, Koopman P. (2000) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol.* 227(2):239-55.

Brunelli S, Silva Casey E, Bell D, Harland R, Lovell-Badge R. (2003) Expression of Sox3 throughout the developing central nervous system is dependent on the combined action of discrete, evolutionarily conserved regulatory elements. *Genesis* 36(1):12-24.

Boyer A, Dornan S, Daneau I, Lussier J, Silversides DW. (2002) Conservation of the function of DMRT1 regulatory sequences in mammalian sex differentiation. *Genesis* 34(4):236-43.

Bullejos M, Koopman P. (2001) Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn.* 221(2):201-5.

Clépet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1993) The human SRY transcript. *Hum Mol Genet.* 2(12):2007-12.

Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, 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(2):509-20.

Daneau I, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW. (1996) Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biol Reprod.* 55(1):47-53.

Daneau I, Pilon N, Boyer A, Behdjani R, Overbeek PA, Viger R, Lussier J, Silversides DW. (2002) The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis* 33(4):170-80.

De Santa Barbara P, Mejean C, Moniot B, Malcles MH, Berta P, Boizet-Bonhoure B. (2001) Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod.* 64(3):775-83.

Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Soullier S, Jay P, Berta P, Boizet-Bonhoure B. (1998) Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining SRY promoter. *Biochim Biophys Acta* 1397(3):247-52

Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JA. (1992) Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature* 359(6395):531-3.

Foster JW, Graves JA. (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(5):1927-31.

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(6281):245-50.

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

Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI. (2000) SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev.* 91(1-2):403-7.

Hossain A, Saunders GF. (2001) The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem.* 276(20):16817-23

Just W, Rau W, Vogel W, Akhverdian M, Fredga K, Graves JA, Lyapunova E. (1995) Absence of Sry in species of the vole *Ellobius*. *Nat Genet.* 11(2):117-8.

Katoh K, Miyata T. (1999) A heuristic approach of maximum likelihood method for inferring phylogenetic tree and an application to the mammalian SOX-3 origin of the testis-determining gene SRY. *FEBS Lett.* 463(1-2):129-32.

Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, Venter JC. (2003) The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* 301(5641):1898-903.

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.

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(6300):450-2.

Margarit E, Guillen A, Rebordosa C, Vidal-Taboada J, Sanchez M, Ballesta F, Oliva R. (1998) Identification of conserved potentially regulatory sequences of the SRY gene from 10 different species of mammals. *Biochem Biophys Res Commun.* 245(2):370-7.

Marshall Graves JA. (2002a). The rise and fall of SRY. *Trends in Genetics* 18(5):259-264.

Marshall Graves JA. (2002b) Evolution of the testis-determining gene- the rise and fall of SRY. *The genetics and biology of sex determination.* Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 244) p86-101.

Meyers-Wallen VN. (2003) Sry and Sox9 expression during canine gonadal sex determination assayed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Reprod Dev.* 2003 65(4):373-81.

Méthot D, Reudelhuber TL, Silversides DW. (1995) Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 23(22):4551-6.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. (2003) *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wienberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, Marshall Graves JA.

(1999) The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 286(5439):458-62, 479-81.

Parma P, Pailhoux E, Cotinot C. (1999) Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. *Biol Reprod.* 61(3):741-8.

Payen E, Pailhoux E, Abou Merhi 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(3):567-75

Pilon N, Daneau I, Paradis V, Hamel F, Lussier JG, Viger RS, Silversides DW. (2003) Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. *Biol Reprod.* 68(4):1098-106.

Rizzoti K, Brunelli S, Carmignac D, Thomas PQ, Robinson IC, Lovell-Badge R. (2004) SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet.* 36(3):247-55.

Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G, Lovell-Badge R. (2004) SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol.* 274(2):271-9.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346(6281):240-4.

Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, Hansen CT, Overbeek PA. (1991) FVB/N:

an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(6):2065-9.

Tucker PK, Lundrigan BL. (1993) Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. *Nature* 364(6439):715-7.

Waterston RH et al. (Mouse Genome Sequencing Consortium). (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420(6915):520-62.

Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson JL. (2003) Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol.* 23(22):8084-91.

Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1993) Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature* 364(6439):713-5

CHAPITRE IV

Pre-Sertoli specific gene expression profiling reveals differential expression of *Ppt1* and *Brd3* genes within the mouse genital ridge at the time of sex determination

ALEXANDRE BOYER, JACQUES G. LUSSIER, ANDREW H. SINCLAIR, PETER J. McCLIVE, AND DAVID W. SILVERSIDES

BIOLOGY OF REPRODUCTION 2004, 71 : 820-827

Pre-Sertoli specific gene expression profiling reveals differential expression of *Ppt1* and *Brd3* genes within the mouse genital ridge at the time of sex determination¹

Alexandre Boyer², Jacques G. Lussier², Andrew H. Sinclair³, Peter J.

McClive³, David W. Silversides^{2,4}

2-Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada

3-Murdoch Children's Research Institute and Department of Pediatrics, University
of Melbourne, Royal Children's Hospital, Melbourne, Australia

1- Supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to D.W.S, and by a travel grant from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) to A.B.

4- Correspondence to: David W. Silversides, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.
Tel: 1-450-773-8521 (ext.8464); Fax: 1-450-778-8103; e-mail:

████████████████████

ABSTRACT

In mammals, testis determination is initiated when the *SRY* gene is expressed in pre-Sertoli cells of the undifferentiated genital ridge. Via currently ill-defined mechanisms, *SRY* directs the differentiation of these cells into Sertoli cells and initiates the testis differentiation pathway. Since Sertoli cells are the first somatic cells to differentiate within the developing testis, it is likely that the signals for orchestrating testis determination are expressed within pre-Sertoli cells. We have previously generated a transgenic mouse line that expresses GFP under the control of the pig *SRY* promoter, thus marking pre-Sertoli cells via fluorescence. We have now used suppression subtractive hybridization (SSH) to construct a normalized cDNA library derived from FACS purified pre-Sertoli cells taken from 12.0dpc fetal transgenic mouse testes. A total of 35 cDNAs for known genes were identified. Detection of *Sfl*, a gene known for its role in sex determination as well as *Vanin-1*, *Vcp1*, *Sparc* and *Aldh3a1*, four genes previously identified in differential screens as gene overexpressed in developing testis compared to ovaries, support the biological validity of our experimental model. Whole mount *in situ* hybridization (WISH) was performed on the 35 candidate genes for qualitative differential expression between male and female genital ridges. The expression pattern of two genes, *Ppt1* and *Brd3*, were examined in further detail. We conclude that combining transgenically marked fluorescent cell populations with differential expression screening is useful for cell expression profiling in developmental systems such as sex determination and differentiation.

INTRODUCTION

The *SRY* gene was identified more than 14 years ago and is considered the dominant positive genetic factor responsible for initiating testis development in eutherian mammals (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991). It is generally accepted that *Sry* triggers the differentiation of Sertoli cells from a cell population that would otherwise become follicular cells. Surprisingly, the molecular mechanisms by which *SRY* accomplishes this remain enigmatic. In the mouse, *Sry* expression within the genital ridge is first detected at 10.5 days postcoitus (dpc); expression peaks at 11.5 dpc and ends at 12.5 dpc (Hacker *et al.*, 1995; Bullejos *et al.*, 2001). Lineage tracing experiments demonstrate that *Sry* is expressed within pre-Sertoli cells (Albrecht and Eicher, 2001, Daneau *et al.*, 2002). Pre-Sertoli cells induce cell proliferation, vascularization and testis cord formation within the developing testis (Tilman and Capel., 1999; Schmahl *et al.*, 2000) as well as the migration of myoid, endothelial and interstitial precursor cells into the gonads from the underlying mesonephros (Martineau *et al.*, 1997; Capel *et al.*, 1999). Sertoli cells provide morphogenic signalling to other cell types, inducing steroidogenic precursor cells to differentiate into Leydig cells, causing germ cells to enter mitotic arrest and resulting in the elimination of paramesonephric duct cells via apoptosis.

Most of the genes currently known to play a role in the process of sex determination and differentiation have been identified from human and mouse models. Studying human patients showing sex reversal or dysgenesis of the gonads has revealed roles for genes such as *Sry* itself, *Sox9*, *Dmrt1*, *Dax1*, *Wtl* (Andersson *et al.*, 1986, Sinclair *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 1995; Pelletier *et al.*, 1991). Phenotypic anomalies in sex determination observed in knockout mouse models have further implicated genes such as *M33*, *Lhx9*, *Sfl* (Katoh-Fuui *et al.*, 1998; Birk *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 1994). One gene, *Dmrt1*, was identified via a combination of homology with *Drosophila* and *C. elegans* genes (Raymond *et al.*, 1999a) as well as human dysgenesis of the gonads (Raymond *et al.*, 1999b). More recently, to identify additional candidate genes as well as signalling pathways

implicated in these processes, differential expression-based screening approaches were undertaken by several labs (Bowles et al., 2000; Wertz and Hermann, 2000; Menke and Page, 2002; Smith et al., 2003; McClive et al., 2003). Although procedures varied somewhat, all of the screens reported to date have in common the tissue level comparison of developing testis with developing ovaries at a given developmental date.

To characterize in more details the expression profile of pre-Sertoli cells at the beginning of sex differentiation as well as to identify new candidate genes involved in sex determination and differentiation, we used a transgenic mouse model expressing GFP under the control of 4.5Kb of the pig *SRY* 5' flanking region (pSRYp-GFP) (Daneau et al., 2002) to isolate and purify pre-Sertoli cells via fluorescence. RNA from 12.0-12.5 dpc pre-Sertoli cells was subtracted against non-fluorescent cells from the male genital ridge using suppression subtractive hybridization (SSH). Gene sequencing followed by whole mount in situ hybridization (WISH) on selected clones allowed us to identify new candidate genes involved in mammalian sex determination and differentiation and to confirm the utility of using transgenically labelled cell population for SSH applications in development.

MATERIAL AND METHODS

Transgenic mice, cell collection and RNA isolation

The cloning and characterization of 4.5Kb of pig *SRY* 5' flanking sequences and the generation of pSRYp-GFP transgenic mice have been described previously (Daneau et al., 2002; Pilon et al., 2003). Mice were housed and handled according to guidelines established by the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (copyright 1996, National Academy of Science), and according to the standards of the institution. For staging of embryonic trials, noon on the day of vaginal plug detection was designated as day 0.5 post conception (0.5 dpc). To isolate fluorescent genital ridge cells from 12.0-12.5 dpc embryos, timed matings

were performed. Dissected genital ridges with mesonephros removed were digested for 30 min at 37°C in M2 media (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with collagenase (50U ml⁻¹)(Gibco, BRL) and dispase (2.4U ml⁻¹)(Gibco, BRL). Fluorescent cells (pre-Sertoli) and non-fluorescent cells (remainder of genital ridge) were separated using fluorescent activated cell sorting (FACS) isolation on a FACSTAR-Plus machine (Becton Dickinson, Mountain View, CA) equipped with an EGFP filter. In total 21,400 fluorescent cells and 22,000 non-fluorescent cells were recovered. Total RNA was extracted using RNeasy total RNA extraction kit (Qiagen). The concentration of total RNA was quantified by measurement of optical density at 260nm, and was deemed sufficient to continue with the procedure (data not shown).

Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

The SSH procedure was performed essentially as previously described (Fayad et al., 2004), with changes appropriate to the mouse model system as described. SSH was used to compare gene expression between fluorescent and non-fluorescent cells of 12-12.5 dpc pSRYp-GFP transgenic mouse testis. To generate sufficient amounts of double-stranded cDNA for SSH, fluorescent and non-fluorescent cDNAs were amplified separately using the SMART PCR cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON). To generate the first strand cDNA, 0.3 µg of total RNA from fluorescent and non-fluorescent cells was reverse-transcribed with an oligo-dT30 primer (CDS: 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT₍₃₀₎(A/C/G/T)(A/G/C)-3') using PowerScript reverse transcriptase (BD Biosciences Clontech). Second cDNA strands were produced with the SMART II 5'-anchored oligo, followed by PCR amplification for 21 cycles using Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences, Clontech). The final PCR products consisted of pools of cDNA fragments in the range of 300bp to 4Kb. The fluorescent cell cDNAs (F) were subtracted against the non-fluorescent cell cDNAs (NF) using PCR-Select cDNA subtraction technology

according to the provided protocol (User manual: PT1117-1; BD Biosciences, Clontech), to give (F-NF) subtraction cDNA pool.

For the (F-NF) cDNA pool, the efficiency of normalization and subtraction was assessed by comparing the abundance of given cDNAs before and after subtraction. This was accomplished via PCR amplification, using mouse specific primers for the constitutively expressed gene glyceraldehyde 3-phosphatase dehydrogenase gene (*Gapdh* sense: 5'-TGTTCCAGTATGATTCCACCCACG-3'; *Gapdh* anti-sense: 5'-CTGTTGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'), for *SOX9*, a gene known to be expressed and upregulated in pre-Sertoli cells at the time of sex differentiation (*Sox9* sense: 5'-GCAAGCTGGCAAAGTTGA-3'; *Sox9* anti-sense: 5'-TGCTGCTTCGACATCCACACGTG-3') and for GFP (GFP sense: 5'-AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3'; GFP antisense: 5'-CCAGGATGTTGCCGTCCTCCT-3'). PCR amplification was performed using Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech), and 5 μ l aliquots were removed at various numbers of PCR cycles for analysis.

Cloning of subtracted cDNAs

Sequences from the (F-NF) genital ridge cell subtracted cDNA pool were cloned into the pT-Adv plasmid (BD Biosciences, Clontech), to construct the fluorescent minus non-fluorescent (F-NF) subtracted cDNA library. Ligated DNA was used to transform competent TOP10F' *E.coli*, which was plated onto X-Gal/LB agar containing kanamycine (40 μ g/ml). Individual colonies were transferred into 96-well plates, grown in LB freezing media (8.8% glycerol, 55mM K₂HPO₄, 1mM MgSO₄, 15mM NH₄(SO₄), 26mM KH₂PO₄) for 14hr at 37°C and then frozen at -70°C.

Differential hybridization screening

Differential hybridization screening was performed following previously described methodologies (Fayad et al., 2004). The (F-NF) genital ridge cell cDNA

library was used to established macro-arrays for differential screening. The insert of each cDNA clone was amplified in 96-well plates by PCR (25 cycles) using the PCR-nested primers 1 and 2R as supplied by the manufacturer (Clontech), and AmpliTaq DNA polymerase (Roche Molecular Systems Inc, Laval, PQ). To establish the cDNA macro-arrays, an aliquot of each amplification product was denatured in 0.3M NaOH with 5% bromophenol blue, and 10 μ l was vacuum transferred onto a nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) using a 96-well dot-blot apparatus. Membranes were then exposed to 150mj UV light to perform DNA cross-linking (Gs Gene Linker, Bio-Rad, Mississauga, ON). Control cDNAs (*GAPDH*, *GFP*) were transferred onto the macro-arrays. For each 96-well plate, three identical cDNA macro-array replicate membranes were generated.

The (F-NF), (F) and (NF) cDNA pools were used to generate complex hybridization probes for differential screening of macro-arrays of the (F-NF) genital ridge cell cDNA library. cDNA pools were first amplified by performing the secondary nested-PCR, and products purified using Qiaquick PCR purification kit (Qiagen). To prevent non-specific interaction of the probes to cDNAs on macro-arrays during hybridization, the adaptors were removed by three successive digestions with *AfaI*, *SmaI* and *EagI*. The cDNA mixtures were again purified (Qiaquick PCR purification kit, Qiagen) and 75 to 100ng was labelled with ³²P-dCTP via random priming (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech). The radioactive probes were purified (QIAquick Nucleotide Removal kit, Qiagen) and quantified using a beta-counter.

The cDNA macro-array membranes were incubated for 4hr at 71°C in 20ml of prehybridization solution (600mM NaCl, 120mM Tris pH 7.4, 4mM EDTA, 0.1% Na₄P₂O₇, 0.2% SDS, and 500 μ g/ml heparin) to which heat denatured (5min, 100°C) oligos were added to prevent non-specific binding. These oligos included 1mM each of PCR-Nested 1; PCR-Nested 2R; PCR-Nested 1 INV (5'-ACCTGCCCCGGGCGGCCGCTCGA-3'); PCR-Nested 2R-INV (5'-ACCTCGGCCGCGACCACGCT-3'); as well as 2mM poly dAdT (Amersham-Pharmacia Biotech). Equal cpm amounts of each of the three heat-denatured cDNA

probes were added to separate 15ml aliquots of hybridization solution and used to individually hybridize the replicated (F-NF) cell macro-array membranes. The hybridization solution was identical to the prehybridization solution with the addition of 15µg salmon sperm DNA and 10% dextran sulfate. The membranes were hybridized for 16hrs at 71°C, then were washed for 15min in 2XSSC and 0.1%SDS followed by two one hour washes in 0.1X SSC and 0.1% SDS at 71°C. Membranes were exposed to a phosphor screen for 4hrs and the images were digitized (Storm 840; Amersham-Pharmacia Biotech). The differentially hybridizing cDNA clones were further characterized by DNA sequencing and whole mount in situ hybridization (WISH).

DNA sequencing and sequence analysis

The cDNA clones identified as differentially expressed by the (F-NF) cell cDNA probe were amplified by PCR for 15 cycles with the PCR-nested 1 and PCR-nested 2 oligos from the PCR product generated initially for the macro-array analysis. The PCR product was purified (QIAquick, QIAgen) and verified by agarose gel analysis for the presence of a single cDNA band before proceeding with sequencing. Sequencing reactions were performed on cDNA clones via the dideoxy sequencing method (Big dye terminator 3.0; ABI prism, Applied BioSystem, PE, Branchburg, NJ) using the oligo PCR-Nested 1 (1mM). Sequencing reactions were analyzed on an ABI Prism 310 sequencer (Applied Biosystem). Nucleic acid sequences were analyzed by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) against GenBank data banks (NR, EST and mouse genome). A cDNA sequence was considered homologous to a GenBank sequence when at least 100bp matched with an E probability value of less than e^{-10} .

WISH

The cDNA clones of the known genes that were differentially expressed in the SSH experiment were further characterized via WISH. To provide a standardised method for generating linear template DNA, clones were amplified by

PCR using SP6-PCR-Nested1 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3') and T7-PCR-Nested2 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3'). The PCR products were used as templates to generate DIG-labelled antisense riboprobes for WISH as previously described (Andrews et al., 1997). The PCR products were transcribed using Sp6 or T7 RNA polymerase as appropriate. Expression was analyzed in 11.5, 12.5 and 13.5 dpc gonads, using two pairs of embryos of each sex per gene.

Depletion of Germ Cells by Busulfan

Two cDNA sequences were selected for a expression analysis in embryos lacking germ cells. These embryos were generated by injecting pregnant females with 40mg/kg busulfan at 9.5 dpc and then harvesting embryos at 12.5-13.5 dpc (McClive and Sinclair, 2003). As a control for this experiment, expression of *Chkl* gene, known to be expressed in germ cells but not in pre-Sertoli cells, was verified in germ cell depleted embryos.

RESULTS

Isolation of pre-Sertoli Cells

pSRYp-GFP positive embryos from timed matings were dissected at 12.0-12.5 dpc and fluorescent (pre-Sertoli) cells and non-fluorescent cells from the genital ridge were efficiently separated via FACS purification. RT-PCR was performed on RNA from fluorescent cells to reveal the presence of endogenous *Sry* transcripts and the absence of *Oct4* transcripts, consistent with the fluorescent cells being of pre-Sertoli cell lineage and not of germ cell lineage (Daneau et al., 2002).

Production of Subtracted Libraries and Assessment of Normalization and Subtraction Efficiencies

To verify the efficiency of the SSH procedure, several control experiments were performed. To insure that normalization of cDNAs had occurred, the quantity of the house keeping gene *Gapdh* was assessed in subtracted (F-NF) and unsubtracted (F) cDNA pools. As expected, *Gapdh* abundance was decreased following subtraction (Fig. 1A). To assess the efficiency of enrichment of differentially expressed genes, the abundance of transcripts for *GFP* and *Sox9* (pre-Sertoli cell expressed gene) was examined. Both *GFP* and *Sox9* transcripts were enriched in the pre-Sertoli cell subtracted (F-NF) cDNA pools (Fig. 1B,C).

Once the subtraction efficiency was shown to be satisfactory, a differential hybridization screening procedure was performed on 658 bacterial colonies randomly selected from the (F-NF) subtracted cDNA library. The (F-NF) subtracted cDNA pool as well as (F) and (NF) non-subtracted cDNA pools were used to generate three different hybridization probes for the differential screening of the selected clones spotted on three identical sets of macro-arrays. Representative differential screening results are illustrated in Fig. 2. The differential screening procedure identified 154 cDNA clones as true positives, i.e. showing enhanced expression via the (F-NF) probe compared to the (F) probe. 110 of these clones were analysed by sequencing and 90 generated adequate sequencing results. Comparison of the cDNA sequences obtained with GenBank sequence databases revealed that 38.8% (35/90) corresponded to known genes, 16.6% (15/90) corresponded to GFP and that 44.4% (40/90) of the sequenced clones corresponded to novel genes (analysis to be presented elsewhere). Only 6 sequences were identified more than once except for GFP which was identified 15 times. Among the known expressed genes identified was *Sfl*, a gene expressed in the genital ridge and implicated in sex determination/differentiation. In addition *Vanin-1*, *Vcp1*, *Sparc* and *Aldh3a1* were identified, representing genes that were previously identified in screens of fetal testis versus ovaries (Bowles et al., 2000; Wertz and Herrmann 2000; McClive et al., 2003).

Figure 1. Abundance of specific cDNA transcripts in subtracted versus non-subtracted cDNA pools of fluorescent (pre-Sertoli) cell cDNAs, as estimated by PCR analysis. Subtraction was performed using cDNA from non-fluorescent genital ridge cells. A) Reduction in the abundance of *Gapdh* transcript in subtracted compared to non-subtracted fluorescent cell cDNA pools (compare cycles 15); (B) enrichment of *Sox9* transcript within the subtracted cDNA pool (compare cycles 21); (C) enrichment of *GFP* transcript within the subtracted cDNA pool (compare cycles 15). Mw represents molecular weight markers.

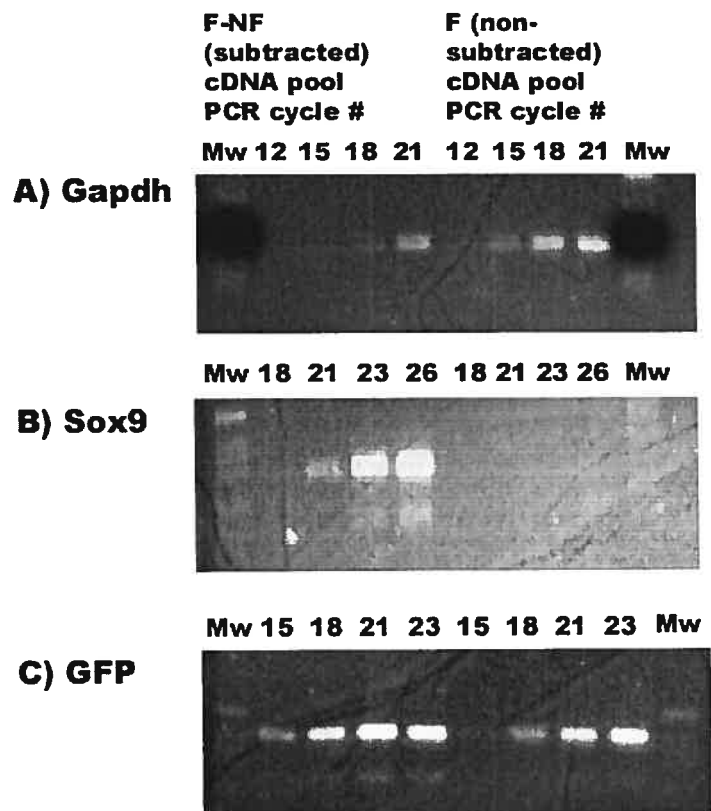
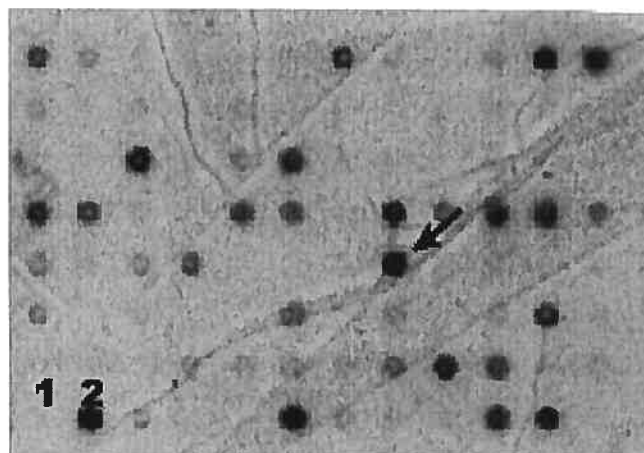
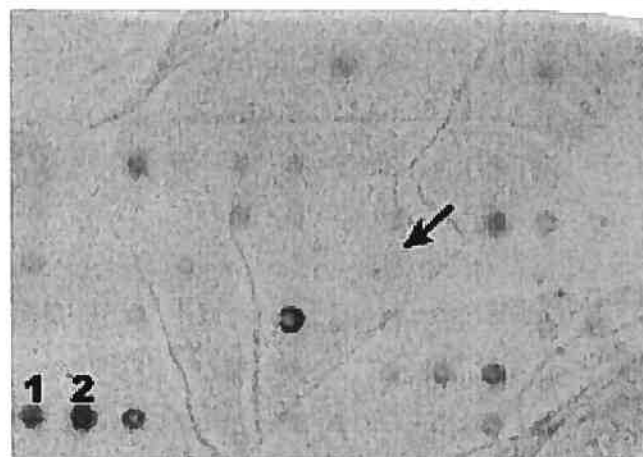
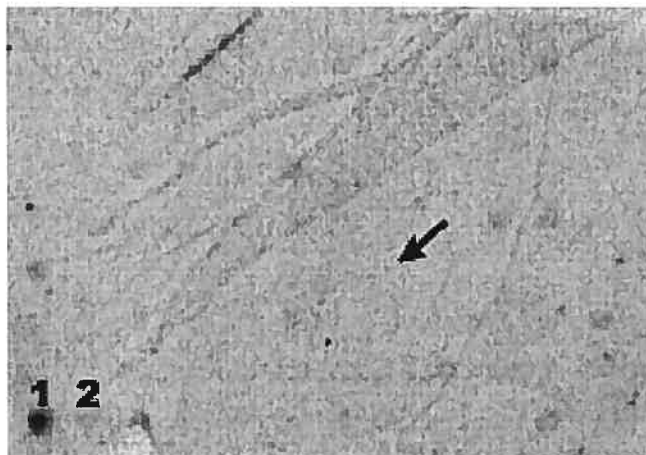


Figure 2. Example of differential screening results by macro-arrays of the fluorescent subtracted by non-fluorescent (F-NF) cell cDNA library using three different cDNA probes as follows: (A) fluorescent cell subtracted by non-fluorescent cell cDNA probe; (B) fluorescent cell (unsubtracted) cDNA probe; and (C) non-fluorescent cell (unsubtracted) cDNA probe. Controls include sequences for *Gapdh* (1) and for *GFP* (2). Arrows indicate the position of clone representing *Sfl* sequences.

**F-NF subtracted cDNA library
membrane replicates:****Probe:****A)****F-NF cDNA
pool
(subtracted)****B)****F cDNA
pool
(unsubtracted)****C)****NF cDNA
pool
(unsubtracted)**

Analysis of mRNA Expression

To verify that genes identified by SSH are differentially expressed between pre-Sertoli cells and the Leydig/endothelial and germ cell compartments and to test whether these genes are also differentially expressed between male and female embryos, whole-mount *in situ* hybridizations (WISH) on male and female embryos was performed. Initial screening was carried out using 12.5 dpc embryos of both sexes for the 35 known genes. Most of these genes (25) were expressed in both sexes; 6 genes were overexpressed in testis; 1 gene was overexpressed in ovaries; and no expression was detected for 3 genes (Table 1). Representative examples of WISH results are shown in Fig. 3 for the genes *Catna*, *Sparc*, *Fdxr*, *Hmgcs2* and *Rgs2*. For the clones showing sex specific or over-expression patterns in gonads of one sex, additional *in situ* experiments were performed at 11.5, 13.5 and 14.5 dpc. The expression pattern of *Palmitoyl-protein thioesterase 1 (Ppt1)* and *Bromodomain containing 3 (Brd3)* are shown here (Fig. 4A,B). At the detection level of the WISH procedure, *Ppt1* is only detected in the developing testis. In contrast, *Brd3* is ubiquitously expressed but is more strongly expressed in the testis compared to the ovaries (Fig. 4B) and to other tissues (data not shown). To further confirm that these genes are expressed in the pre-Sertoli cell population and not within germ cells, WISH was performed on embryos lacking germ cells after treating pregnant females with busulfan (Fig.5).

DISCUSSION

In mammals, Sertoli cells are thought to be the first cell lines of the genital ridge to commit to the male differentiation pathway and additionally to recruit other cell types to the male pathway via paracrine and contact signaling. Characterization of the specific subset of genes differentially expressed in pre-Sertoli cells compared to the other cell types present within the genital ridge at the moment of sex determination should provide further understanding of the molecular processes involved in sex determination and sex differentiation. To further study these

Table 1. Identity of cDNA clones found to be differentially expressed by SSH in fluorescent compared to non-fluorescent cells of mouse genital ridge.

Function, Gene Symbol*	Gene name	GenBank	UniGene cluster (Mm)	Expression 12.5dpc, (testes, ovaries, both, n.d.) [†]
Cellular cycle and growth				
Cdc91L1	Cdc91 cell division cycle 91-like 1	XM130696	5434	n.d.
Mrgx	Mrgx pending	NM019768	27 218	Both
Sept2	Septin 2	NM010891	242 324	Both
Intracellular transport				
Abcd3	ATP binding cassette family member D3	NM008991	194 462	n.d.
Dctn4	Dynactin 4	NM026302	256 520	Both
Myo10	Myosin X	NM019472	60 590	Both
Actn4	Actinin alpha 4	NM021895	276 042	Both
Vcp	Valosin-containing protein	NM009503	262 053	Both
Pex14	peroxisomal biogenesis factor 14	NM019781	184 172	Both
Mtap1A	microtubule-associated protein 1 A	XM194040	227 093	Both
transport				
Cfr (n=2)	ATP binding cassette sub-family C	NM021050	15 621	Both
Transcription				
Sfl	Stereogenic factor-1	NM139051	31 387	Testes, (Cords)
Brd3	Bromodomain containing-3	NM023336	28 721	Overexpressed in testes, (Cords)
Enzymes				
Ldh2 (n=2)	Lactate dehydrogenase 2	NM008492	9745	Both
Siat1	Sialyltransferase 1	NM145933	213 222	Both
Fdxr	Ferredoxin reductase	NM007997	4719	Both

Ppt1 (n=2)	Palmytoil-protein thioesterase	NM008917	207 339	Testes (Cords)
Gatm	Glycine amidinotransferase	NM025961	29 975	Both
Txnl	Thioredoxin-like	NM016792	19 169	Both
Vnn1	Vanin 1	NM011704	27 154	Overexpressed in testes (Cords)
Kars	Lysil-tRNA synthetase	NM053092	196 544	Both
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	NM008256	289 131	Both
Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1	NM007436	4257	Both
Ctsb	Cathepsin B	NM007798	236 553	Both
Gus	Beta-glucuronidase	NM010368	3317	Both
Sar1	IQ motif containing GTP-ase activating protein	NM080476	207 619	n.d.
Signal transduction				
Rgs2	Regulator of G-protein signaling 2	NM009061	28 262	Female
Ptpn1	Tyrosine phosphatase non-receptor type 1	NM011201	277 916	Both
SellL	sel-1 suppressor of lin-12-like	XM127076	250 605	Testes (Cords, Interstitium)
Structure				
Catna	Catenin alpha 1	NM009818	18 962	Overexpressed in testes (Cords)
Cgn	Cingulin	XM131052	87 634	Both
Sparc	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	NM009242	291 442	Overexpressed in testes (Cords, Interstitium)

*Genes detected twice by SSH are represented by (n=2)

† Genes detected by SSH but not by WISH are indicated by n.d.

Figure 3. Examples of different WISH expression patterns observed, using 12.5-dpc genital ridges for the following genes: **(A)** *Catna* and **(B)** *Sparc*, displaying testis-specific expression within interstitial cells; **(C)** *Fdxr* and **(D)** *Hmgcs2*, displaying expression within both testes and ovaries; and **(E)** *Rgs2*, displaying enhanced expression within ovaries. Testes (t) are presented on the left and ovaries (o) are presented on the right. Magnification 40X.

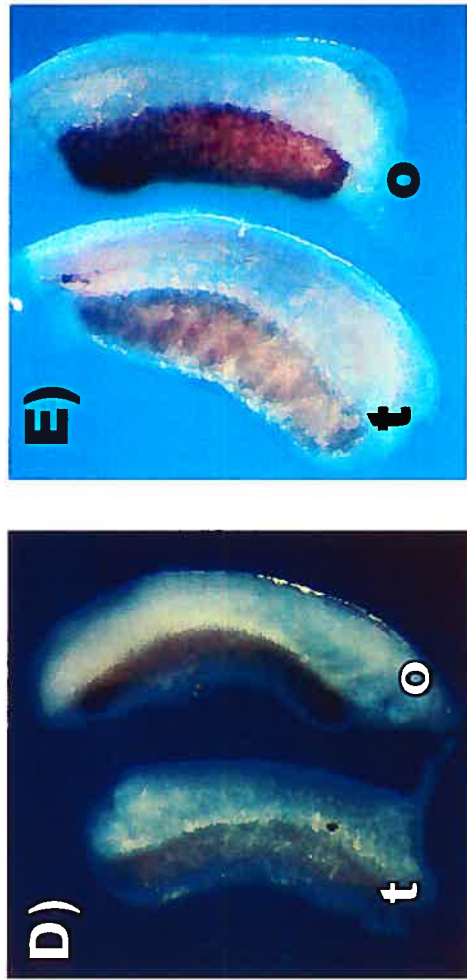
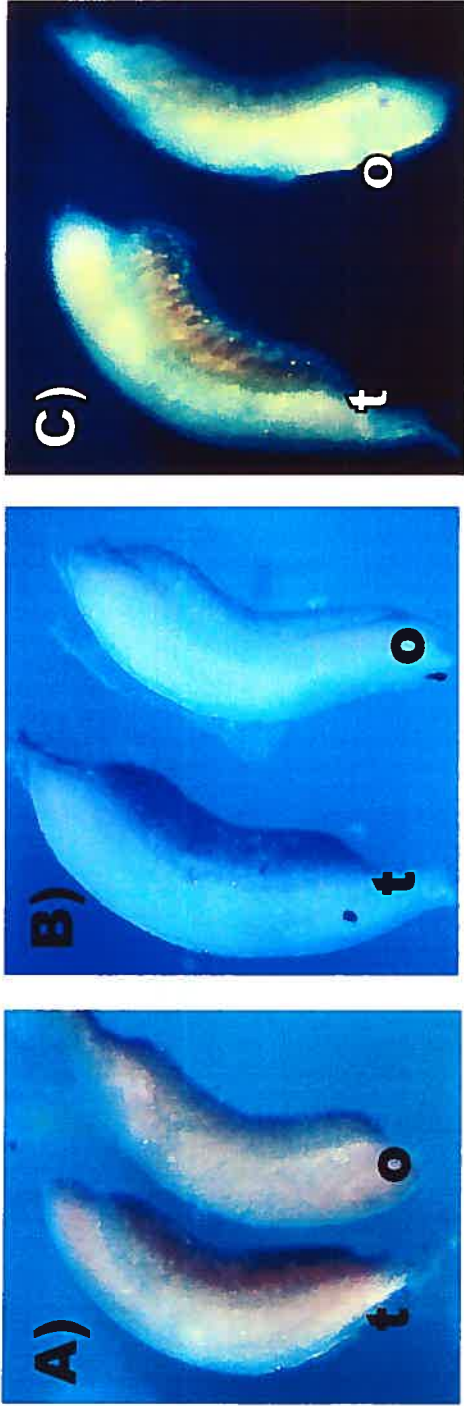


Figure 4. Testicular cord WISH expression of *Brd3* and *Ppt1* genes in mouse fetal gonads at different developmental time points. **A-D)** *Brd3* gene expression at 11.5, 12.5, 13.5, and 14.5 dpc, respectively. At 11.5 dpc, a comparable diffuse expression pattern was seen within both testes and ovaries but not within the mesonephros. By 12.5 dpc, strong expression was seen within the testicular cords, and this pattern continued until at least 14.5 dpc. Faint expression was still evident within the ovaries at 13.5 dpc and 14.5 dpc. **E-H)** *Ppt1* gene expression at 11.5, 12.5, 13.5, and 14.5 dpc, respectively. At 11.5 dpc, faint expression was detected within the genital ridges of both sexes. By 12.5 dpc, strong expression of *Ppt1* was seen within the testicular cords of the male genital ridge; this pattern continued until at least 14.5 dpc. Expression of *Ppt1* was no longer evident within the ovary by 14.5 dpc. Testes (t) are presented on the left and ovaries (o) are presented on the right. Magnification 32X.

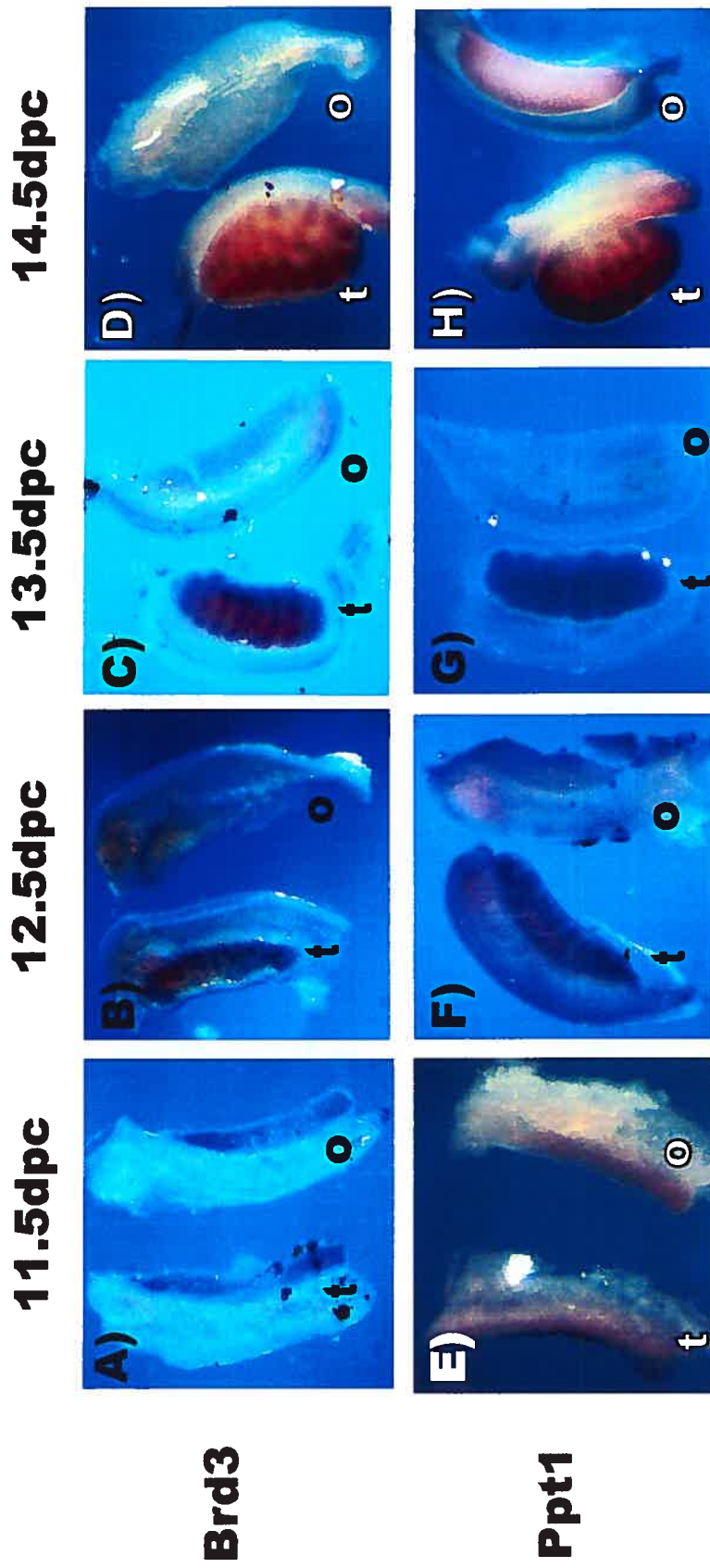
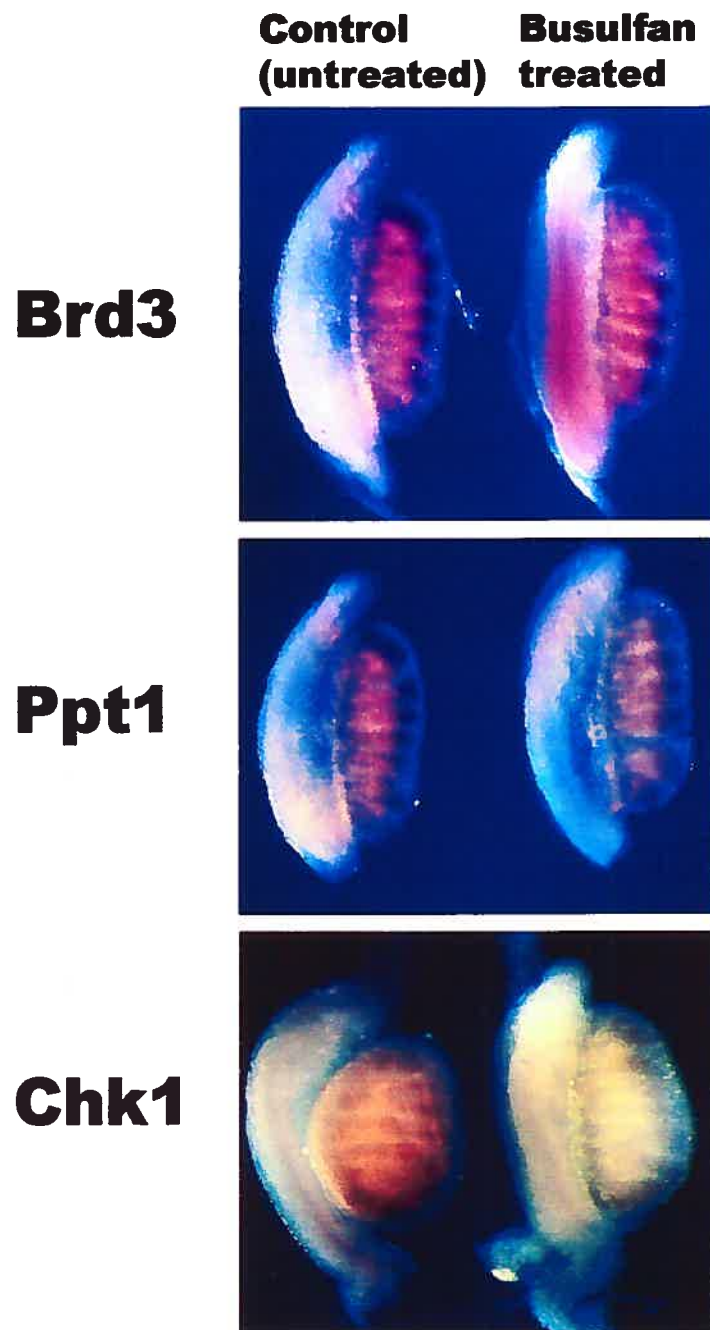


Figure 5. Effect of busulfan treatment on WISH expression of *Brd3* and *Ppt1* genes (from pre-Sertoli cell expression profiling screen) and of *Chk1* gene (a germ cell marker) within mouse fetal testes between 12.5 and 13.5 dpc. Left testis is from a normal embryo; right testis is from a busulfan-exposed embryo. For the *Brd3* and *Ppt1* genes, expression was equivalent in the control and the busulfan-treated testes, suggesting that expression is within the pre-Sertoli cell compartment and not within the germ cell compartment. Expression of *Chk1* gene, known to be expressed within germ cells but not within pre-Sertoli cells, is reduced (but not absent) in the busulfan-treated testes compared with control (untreated) testes. Magnification 32X.



processes a mouse transgenic line expressing GFP under the control of 4.5Kb of pig *Sry* promoter (Daneau et al., 2002) was used to isolate pre-Sertoli cells at day 12.0dpc. These cells were purified by FACS, and a SSH screen was performed to identify genes that are differentially expressed in fluorescent cells (F) compared to non-fluorescent cells (NF).

Screening the (F-NF) subtracted cDNA library allowed the identification of 35 known genes whose analysis is presented herein. These genes included *Sfl*, known for its role in sex determination/differentiation, as well as *Vanin-1*, *Sparc*, *Vcp1* and *Aldh3a1*, four genes previously identified in published screens for genes overexpressed in developing testis compared to ovaries (McClive et al., 2003; Bowles et al., 2000; Wertz et al., 2000). Furthermore, we confirmed by PCR that *Sox9* is overexpressed within the (F-NF) subtracted cDNA pool compared to the (F) non-subtracted cDNA pool. The identification of these genes provides an important confirmation of the biological validity of our current model. Other genes known to be implicated in sex determination, such as *Dmrt1*, *Gata4* or *Sry*, were not found in our current screen, possibly due to the relatively small sample size of clones screened and the potentially large complexity of the cDNA population of the developing testis. This possibility is supported by the relatively lack of redundancy of sequences identified in contrast to other reported profiling experiments (Fayad et al., 2004)

The known genes identified by SSH were further characterized via WISH to determine differential expression patterns within the developing testis and also between developing testis and ovaries. A high proportion of the genes tested by WISH, (21/35) were expressed in both developing testis and ovaries. This is not surprising due to the common origin of Sertoli and granulosa cells (Albrecht and Eicher, 2001) and the fact that our subtraction was not between testicular and ovarian cells. This included genes known to be implicated with Sertoli cells, such as *Cftr*, implicated in nutrition of spermatozooids (Boockfor et al., 1998) and *Gatm* involved in creatine biosynthesis. In addition, genes involved with energy metabolism were identified, including *Ptpn1* which acts as a negative regulator of insulin signaling. Recently, it was demonstrated that insulin receptor family

members are needed for testes determination (Nef et al., 2003). The fact that for 3 genes there was no WISH signal detected could be explained by the moderate sensitivity of the WISH method or simply be due to technical failure.

For the 7 genes showing a differential expression between testes and ovaries, *SF-1*, *Vanin-1* and *Ppt1* were only expressed in pre-Sertoli cells, *Brd3* and *SellL* were more strongly expressed in pre-Sertoli cells compared to interstitial cells, while *Catna1* and *Sparc* were expressed equally in pre-Sertoli cells and interstitial cells. Two genes, *Fdxr* and *Hmgcs2*, were expressed in both testicular and ovarian genital ridges. One gene, *Rgs2*, was found to be overexpressed in ovaries compared to testes at 12.5dpc, but on closer examination was observed to be down regulated in ovaries at 13.5dpc underscoring the fact that sex differentiation occurs later in ovaries than in testis.

Ppt1 and *Brd3* were selected for more detailed characterization of genital ridge expression. *Ppt1* encodes a soluble lysosomal enzyme that hydrolyzes the thioester bond that attaches long-chain fatty acids, mostly palmitate, to the cysteine residue of S-acylated proteins (Camp et al., 1994, Camp and Hofmann, 1995). Palmitoylation has been shown to be important in different cellular processes including neural cell differentiation (Review: Patterson, 2002) and possibly in insulin-regulated cellular functions (Jochen et al., 1995). Recently, non-lysosomal roles for *Ppt1* were described in synaptosomes (Ahtiainen et al., 2003) and during apoptosis (Cho and Dawson, 2000). It was previously reported that *Ppt1* is ubiquitously expressed in adult tissues with increased expression within the testis (Camp et al., 1994; Salonen et al., 1998); while in *Drosophila*, *Ppt1* shows testicular expression levels 5 time that of other tissues (Glaser et al., 2003). Here, we report that within the mouse genital ridge, via SSH and WISH detection, *Ppt1* was only expressed in pre-Sertoli cells of the developing testis but was not seen in developing ovaries via WISH. Those observations suggest that *Ppt1* may be involved in mammalian sex determination and differentiation.

Brd3 is a potential transcription factor containing 2 bromodomains. Members of this family include *Brd2*, a gene that is strongly expressed in ovaries and testis (both Sertoli and germ cells)(Rhee et al., 1998) and *BrdT* (Pivot-Pajot et

al., 2003), a gene only expressed in the germ cells of the testis. Significantly, this family of genes is related to the female sterile homeotic protein gene in *Drosophila*, a gene required maternally for proper expression of other homeotic genes such as *Ubx*, which is involved in pattern formation. Ubiquitous expression of UBX protein within the mesoderm in *Drosophila* results in the formation of ectopic gonad tissue anterior to the normal location of the gonads (Greig and Akam, 1995). We now provide evidence that *Brd3* may play a role in testis formation in mammals. Identification of *Brd3* expression within the male genital ridge, with increased expression within pre-Sertoli cells compared to other cell types, provides evidence that *Brd3* may play a role in testis formation in mammals, and may help to define the developmental tissue code required for testis formation. Further studies are now required to either confirm or refute these ideas.

In summary, we have combined fluorescent marking of cell populations in transgenic models with differential expression screening to study gene expression in pre-Sertoli cells of the mammalian genital ridge. Using these methods we have identified new candidate genes including *Ppt1* and *Brd3*, whose genital ridge expression patterns suggest they may be involved in the processes of sex determination and differentiation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Diana L. Raiwet for technical assistance and maintenance of mouse lines. Éric Massicotte (IRCM, Montreal) is acknowledged for his help with the FACS purification. This work was supported by a fellowship to A. Boyer from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and research grants from the National Science and Engineering Research Council (NSERC) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR, formally Medical Research Council of Canada).

REFERENCES

- Ahtiainen L, Van Diggelen OP, Jalanko A, Kopra O.** (2003) Palmitoyl protein thioesterase 1 is targeted to the axons in neurons. *J Comp Neurol* 455: 368-377.
- Albrecht KH, Eicher EM.** (2001) Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 240: 92-107.
- Andersson M, Page DC, de la Chapelle A.** (1986) Chromosome Y-specific DNA is transferred to the short arm of X chromosome in human XX males. *Science* 233: 786-788.
- Andrews JE, Smith CA, Sinclair AH.** (1997) Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen Comp Endocrinol*. 108:182-190.
- Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, Porter FD, Westphal H.** (2000) The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403: 909-913.
- Boockfor FR, Morris RA, DeSimone DC, Hunt DM, Walsh KB.** (1998) Sertoli cell expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol* 274: C922-930
- 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.

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

Camp LA, Hofmann SL. (1995) Assay and isolation of palmitoyl-protein thioesterase from bovine brain using palmitoylated H-Ras as substrate. *Methods Enzymol* 250: 336-347.

Camp LA, Verkruyse LA, Afendis SJ, Slaughter CA, Hofmann SL. (1994) Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase. *J Biol Chem* 269: 23212-23219.

Capel B, Albrecht KH, Washburn LL, Eicher EM. (1999) Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev* 84: 127-131.

Cho S, Dawson G. (2000) Palmitoyl protein thioesterase 1 protects against apoptosis mediated by Ras-Akt-caspase pathway in neuroblastoma cells. *J Neurochem* 74: 1478-1488.

Daneau I, Pilon N, Boyer A, Behdjani R, Overbeek PA, Viger R, Lussier J, Silversides DW. (2002) The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis* 33: 170-180.

Fayad T, Levesque V, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG. (2004) Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod* 70:523-533.

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al. (1994)

Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372: 525-530.

Glaser RL, Hickey AJ, Chotkowski HL, Chu-LaGraff Q. (2003) Characterization of *Drosophila* palmitoyl-protein thioesterase 1. *Gene* 312: 271-279.

Greig S, Akam M. (1995) The role of homeotic genes in the specification of the *Drosophila* gonad. *Curr Biol* 5: 1057-1062.

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.

Guo W, Mason JS, Stone CG Jr, Morgan SA, Madu SI, Baldini A, Lindsay EA, Biesecker LG, Copeland KC, Horlick MN, et al. (1995) Diagnosis of X-linked adrenal hypoplasia congenita by mutation analysis of the DAX1 gene. *JAMA* 274: 324-330.

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121: 1603-1614.

Jochen AL, Hays J, Mick G. (1995) Inhibitory effects of cerulenin on protein palmitoylation and insulin internalization in rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1259: 65-72.

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.

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.

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.

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.

McClive PJ, Hurley TM, Sarraj MA, van den Bergen JA, Sinclair AH. (2003) Subtractive hybridisation screen identifies sexually dimorphic gene expression in the embryonic mouse gonad. *Genesis* 37: 84-90.

McClive PJ, Sinclair AH. (2003) Type II and type IX collagen transcript isoforms are expressed during mouse testis development. *Biol Reprod* 68:1742-1747.

Menke DB, Page DC. (2002) Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expression Patterns* 2:359-367.

Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF. (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426:291-295.

Patterson SI. (2002) Posttranslational protein S-palmitoylation and the compartmentalization of signaling molecules in neurons. *Biol Res* 35: 139-150.

Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE. (1991) WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 353: 431-434.

Pilon N, Daneau I, Paradis V, Hamel F, Lussier JG, Viger RS, Silversides DW. (2003) Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. *Biol Reprod.* 68:1098-1106.

Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S. (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 23:5354-5365.

Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. (1999a) Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 215: 208-220.

Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D. (1999b) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* 8: 989-996.

Rhee K, Brunori M, Besset V, Trousdale R, Wolgemuth DJ. (1998) Expression and potential role of *Fsrg1*, a murine bromodomain-containing homologue of the *Drosophila* gene female sterile homeotic. *J Cell Sci* 111:3541-3550.

Salonen T, Hellsten E, Horelli-Kuitunen N, Peltonen L, Jalanko A. (1998) Mouse palmitoyl protein thioesterase: gene structure and expression of cDNA. *Genome Res* 8: 724-730.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.

Smith 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. *Develop Dynam* 227: 600-607.

Tilman C, Capel B. (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* 126: 2883-2890.

Wertz K, Herrmann BG. (2000) Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mech Dev* 98: 51-70.

CHAPITRE V

RÉSULTATS ADDITIONNELS ET DISCUSSION

5.1 LE DÉVELOPPEMENT DES GONADES COMME MODÈLE D'ORGANOGENÈSE CHEZ LES MAMMIFÈRES

Le développement d'un organe nécessite la présence séquentielle de deux grands types de molécules; d'un côté les facteurs contrôlant l'information et de l'autre, les molécules structuro-fonctionnelles. Le premier groupe est constitué des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression du deuxième groupe de molécules qui est constitué des protéines de structure, de remodelage, de transport, des voies de signalisation intracellulaires ou des hormones participant aux interactions cellules-cellules nécessaires à la modulation de la structure de l'organe. La gonadogénèse représente un excellent modèle d'étude pour l'organogénèse chez les mammifères, car contrairement à d'autres systèmes comme le système cardiaque, pulmonaire ou digestif, ce système n'est pas indispensable à la survie de l'individu et de nombreuses mutations génétiques l'affectant ne sont pas létales. En effet, les mutations vont plutôt résulter en une inversion de sexe, la stérilité, l'hermaphrodisme ou pseudo-hermaphrodisme. De plus, la gonadogénèse rajoute une dimension à l'organogénèse, la bipotentialité. Cela fait maintenant 15 ans que le gène *SRY* a été cloné (Sinclair et coll., 1990; Gubbay et coll., 1990) et 14 ans que ce dernier a été identifié comme l'élément responsable, l'interrupteur permettant d'aiguiller la gonadogénèse vers la formation des testicules (Koopman et coll., 1991) et quoique de nombreux autres gènes ont été identifiés et impliqués dans les processus de la détermination et la différenciation du sexe, le lien entre tous ces facteurs demeure incomplet. De nombreux autres gènes encore inconnus pourraient donc faire partie de ce réseau. En résumé, la genèse d'un organe est extrêmement complexe.

5.2 ÉTUDES ÉVOLUTIVES DE LA DÉTERMINATION DU SEXE

Plusieurs facteurs influencent la détermination du sexe chez les diverses espèces. Certaines espèces n'ont pas de chromosomes sexuels dimorphiques et d'autres facteurs comme le pH, la température ou le ratio mâle/femelle influencent

la détermination du sexe (Haqq et Donahoe, 1998). Chez d'autres espèces, la détermination du sexe est chromosomale mais encore là, plusieurs méthodes ont été utilisées pendant l'évolution comme la détermination sexuelle par ploïdie chez les abeilles (résumé par Charlesworth, 2003), la détermination sexuelle dose dépendante chez la drosophile et les nématodes (résumé par Lalli et coll., 2003; Rhind et coll., 1995), et la détermination sexuelle par la présence d'un gène dominant chez les oiseaux et les mammifères (résumé par Clinton et Haines, 2001; Sinclair et coll., 1990). Malgré cette très grande diversité de stratégies pour obtenir des individus mâles et femelles, certains gènes impliqués dans la détermination du sexe ont traversé l'évolution. C'est le cas entre autre de *DMRT1* et de *SOX9* pour lesquels des orthologues étaient déjà impliqués dans la détermination du sexe des invertébrés (DeFalco et coll., 2003; Raymond et coll., 1998). D'un autre côté, des gènes comme *SRY* et *DAX1* n'ont aucun orthologue détectable chez les espèces inférieures aux mammifères.

5.2.1. *DMRT1* VS *SRY*

Le gène *DMRT1* est apparu il y a plus de 600 millions d'années et il est un des rares gènes dont la structure et la fonction sont conservées entre les espèces et même les genres. *Dsx* et *Mab3*, les orthologues de *DMRT1* chez *Drosophila* et *C. elegans* jouent tous deux des rôles dans des fonctions reliées à la détermination et à la différenciation du sexe, soit: au niveau entre autres des organes sensoriels spécifiques aux mâles et du comportement d'accouplement (Baker et Ridge, 1980). Des orthologues de *DMRT1* ont été clonés chez les oiseaux (Smith et coll., 1999), les poissons (Guan et coll., 2000) et les reptiles (Chen et Heckert, 2001). Chez certaines espèces de poissons, un de ces orthologues, *DMY*, est même considéré comme le facteur clé de la détermination du sexe (Matsuda et coll., 2002). Chez les oiseaux, son expression précède l'expression de *Sox 9* (Smith et coll., 2003a), chez l'humain, *DMRT1* est situé sur le locus 9p24.3 (Guioli et coll., 1998) qui, lorsque hémizygoté, est associé à une féminisation des individus XY (Ottolenghi et McElreavy, 2000). Chez la souris, le KO de *Dmrt1* montre que ce gène est

important pour la différenciation du sexe plutôt que la détermination du sexe (Raymond et coll., 1999a).

De son côté, *SRY* est apparu dans l'évolution il y a environ 80 millions d'années et n'a acquis son rôle de facteur de la détermination du sexe que chez les mammifères euthériens, un rôle pour *SRY* chez les marsupiaux n'ayant pas été démontré, du moins pour la détermination du sexe (Foster et coll., 1992). De plus, *SRY* est situé sur le chromosome Y, donc en une seule copie sans possibilité de mécanisme de réparation homologue et est donc sujet à de nombreuses mutations tant au niveau de sa séquence codante que de son promoteur. *DMRT1* et *SRY* sont donc deux gènes importants pour la détermination du sexe, mais diamétralement opposés d'un point de vue évolutif.

5.2.2 CARACTÉRISATION DES PROMOTEURS DE *DMRT1* ET *SRY* IN VIVO

Quoique les séquences du promoteur de *DMRT1* soient nettement mieux conservées (Figure 1, chapitre II) que celles du promoteur *SRY* (Figure 1, chapitre III), notre hypothèse initiale suggérait que les mécanismes régulant l'expression de ces gènes seraient conservés à un degré plus élevé que les séquences proprement dites. Cette hypothèse a été vérifiée par des études de promoteurs de porc (*DMRT1* et *SRY*) et de promoteurs humains (*SRY*) dans des modèles de souris transgéniques. Ce type d'études comparatives et évolutives s'avère important puisque chez la souris, le modèle expérimental le plus versatile pour étudier le développement des mammifères, les gènes peuvent montrer une grande divergence de séquences avec l'humain et d'autres mammifères supérieures comme le porc.

5.2.2.1 EXPRESSION DANS LES CRÊTES GÉNITALES

Dans le cas du promoteur *DMRT1* de porc, les séquences sont fortement conservées et la détection du marqueur de fluorescence GFP se fait uniquement dans les cordons testiculaires à partir du jour e12.5 (Figure 2, chapitre II) soit une

journée après la détection du transcrit endogène et deux jours après la détection du transcrit par PCR (Raymond et coll., 1999a). Des études sur des cellules fluorescentes purifiées démontrent que les cellules de pré-Sertoli et une sous-population des cellules germinales expriment le transgène et que le transcrit endogène est bel et bien exprimé dans les cellules fluorescente (figure 4, chapitre II). Il est donc possible de conclure que les séquences régulatrices de *DMRT1* sont conservées chez les mammifères. *GATA4* pourraient jouer un rôle dans ce contrôle (Lei et Heckert, 2004) et un site potentiel de liaison pour GATA4 est situé à -2 260bp de notre transgène.

Au sujet de l'expression des promoteurs *SRY* porcins et humains, il est possible de voir qu'encore une fois, la majorité de ces transgènes sont exprimés dans les crêtes génitales en formation (Table 1, chapitre III). Par contre, l'expression des transgènes est prolongée ce qui rappelle l'expression du transcrit de *SRY* chez l'humain, le porc, le mouton et le chien plutôt que l'expression de *Sry* murin. Cette différence est issue probablement de la présence de site de liaisons pour SOX9 sur les promoteurs porcins et humains de *SRY*, mais absent sur le promoteur murin empêchant cette boucle de rétroactivation chez la souris. Il est intéressant de constater que pour trois lignées de souris transgéniques différentes, aucune expression n'est détectée dans les crêtes génitales pour le transgène hSRY(3.3)p-RFP. Jusqu'à présent, les études lié au promoteur *SRY* humain décrivent un rôle pour Sp1 (Desclozeaux et coll., 1998), WT1 (Hossain et Saunders, 2001) et SF1 (de Santa Barbara et coll., 2000), mais ces études ont été limitées au premier 1 Kb de promoteur. Nos résultats suggèrent plutôt que la région importante pour l'expression de *SRY* humain dans la crête génitale est située entre -5 Kb et -3.3 Kb. Nous retrouvons également dans cette région des sites de liaison pour WT1 et SF1 mais aucun site pour GATA4 ou SOX9 ce qui sous-entend qu'un facteur encore inconnu mais important pourrait participer à l'activation du promoteur *SRY* humain.

5.2.2.2 EXPRESSION DANS LA CRÊTE NEURALE

Quoiqu'une expression de GFP n'ait pas été détectée dans les cellules de la crête neurale pour la lignée de souris transgéniques pDMRT1p-GFP, il en va autrement lorsque le gène rapporteur est la recombinaise Cre où l'expression est détectée dans les somites et le cerveau. La recombinaise Cre est un rapporteur plus sensible que la GFP et ceci peut expliquer le fait que cette expression n'a pas été détectée préalablement; la recombinaise s'assure que toutes les cellules filles vont exprimer le transgène après l'excision de la séquence lox. Les gènes *DMRT2* et *DMRT3* situés dans le même locus que *DMRT1* sur le chromosome 9 sont exprimés dans le cerveau et les somites (Meng et coll., 1999; Ottolenghi et coll., 2002).

Une expression dans les cellules de la crête neurale est également visible pour de nombreux transgènes du promoteur *SRY* (Table I, chapitre III). Aucune expression de *Sry* n'a été décrite préalablement dans les cellules de la crête neurale, mais par contre, des transcrit de *SRY* ont été détectés dans le cerveau dans différentes espèces (Mayer et coll., 1998, 2000). Il est généralement accepté dans la détermination du sexe que *SRY* a évolué à partir de *SOX3*, un gène situé sur le chromosome X avant le schisme d'autosomes à chromosomes sexuels des chromosomes X et Y (Résumé par Graves, 2002). Il est par ailleurs connu que *SOX3* est exprimé dans les neurones (Brunelli et coll, 2003). La présence de séquences permettant l'expression de *SRY* dans les crêtes neurales pourrait donc qu'être vestigiale. Par contre, cela suggère malgré tout un lien potentiel entre la crête neurale et la crête génitale.

5.3 LIEN ENTRE LA CRÊTE NEURALE ET LA CRÊTE GÉNITALE

Outre les résultats présentés ici, plusieurs autres lignées de souris, exprimant des marqueurs de fluorescence sous le contrôle des promoteurs *LHX9*, *GATA4* et *WT1*, montrent une expression à la crête neurale (résultats de laboratoire non publiés). Pour ces trois mêmes gènes, cette expression est également observée pour l'endogène par whole mount *in situ* (résultats de laboratoire non publiés). De

plus, dans la littérature, il a été démontré que *Sox9* et *Sox8* sont également exprimés à la crête neurale (Shepers et coll., 2000; Cheung et Briscoe, 2003). *Emx2* est également impliqué au niveau neuronal par une interaction avec des gènes de la famille *Fgf* et *Wnt* (Shimogori et coll., 2004) dont certains membres sont impliqués dans la détermination du sexe. Finalement, les KO de *M33* et *Sox3* suggèrent également un rôle au niveau de la crête neurale. Plusieurs expériences ont été entreprises pour tenter de démontrer un lien direct entre les deux populations cellulaires.

5.3.1 ÉTUDES DE MIGRATION

Des études ont été entreprises pour vérifier s'il pouvait y avoir une migration des cellules de la crête neurale vers la crête génitale. Pour ce faire, un système de culture de tissus a été mis au point (Annexe 2). Les études de migration ont été effectuées avec divers transgènes dont les transgènes pSRY(2.6Kb)p-YFP et rGATA4(5.0Kb)p-RFP (promoteur *Gata4* de rat). À la figure 5.1, un exemple d'un tel système de culture est montré pour 41h de culture (la limite de notre système de culture) pour une souris transgénique mâle rGATA4(5.0Kb)p-RFP au jour embryonnaire e11.5. Ces résultats suggèrent qu'une sous-population de cellules provenant la crête neurale migrent vers la crête génitale et pourraient être des précurseurs des cellules pré-Sertoli.

5.3.2 TRANSPLANTATION DE GONADES

Pour prouver la migration des cellules de la crête neurale vers la crête génitale et pour s'assurer que ce sont bien les cellules de la crête neurale qui migrent et non pas de nouvelles cellules qui expriment la fluorescence dans les testicules, de nouvelles études de culture de tissus ont été entreprises en transplantant cette fois-ci la crête urogénitale d'un embryon exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur *Oct4* murin. Nous avons constaté l'infiltration des cellules provenant de la crête neurale dans la gonade de la crête urogénitale greffée (Figure

5.2). De plus, il est possible de vérifier que les cellules provenant de la crête neurale se retrouvent dans le même plan, au même niveau que les cellules germinales marquées par la GFP lorsque cette gonade est observée au microscope confocal (Figure 5.3). Ceci indique que les cellules de la crête neurale pénètrent bel et bien dans le tissu greffé et ne se retrouvent pas seulement à la surface de ce tissu. Il est également possible d'observer que ces cellules entourent les cellules germinales ce qui tend à démontrer qu'il s'agit bien de cellules pré-Sertoli (Figure 5.4). Finalement, les quatre combinaisons possibles de sexe (gonade mâle ou femelle greffée dans une tranche d'embryons mâle ou femelle) ont été observées et il y a migration et infiltration des cellules de la crête neurale peu importe la combinaison utilisée.

5.3.3 MODÈLE HYPOTHÉTIQUE DE LA FORMATION DES TESTICULES

Le modèle tel qu'accepté jusqu'à présent pour la formation des testicules implique la migration des cellules pré-Sertoli de l'épithélium coelomique qui, à ce moment, débutent l'expression de *Sry* (Schmal et coll., 2000) entraînant entre autre la migration des cellules endothéliales et myoépithéliales du mesonephros (Martineau et coll., 1997). Notre hypothèse (Figure 5.5) rajoute à ce modèle une première étape où une sous-population de cellules pré-Sertoli migrent à partir de la crête neurale puis recrutent une seconde population de cellules pré-Sertoli provenant de l'épithélium coelomique. La migration des cellules provenant de la crête neurale étant visible tant chez le mâle que chez la femelle, nous suggérons que chez la femelle, ces cellules meurent par apoptose après avoir atteint les gonades. Une fonction anti-apoptotique pourrait alors être attribuée à *SRY*. Un tel modèle où les cellules somatiques migrent de deux endroits bien distincts n'est pas un précédent puisqu'un tel modèle est observable pour la détermination du sexe chez la drosophile (deFalco et coll., 2003). De plus, chez la drosophile femelle, ces cellules meurent par apoptose après avoir atteint les gonades (deFalco et coll., 2003) comme nous le prédisons pour les mammifères.

Figure 5.1 Étude de migration des cellules de la crête neurale. Culture d'une tranche d'embryon mâle rGATA4(5.0Kb) μ -RFP de 17ts observée à 100X au microscope confocal. **a)** Après 16h de culture. **b)** Après 21h de culture. **c)** Après 41h de culture.

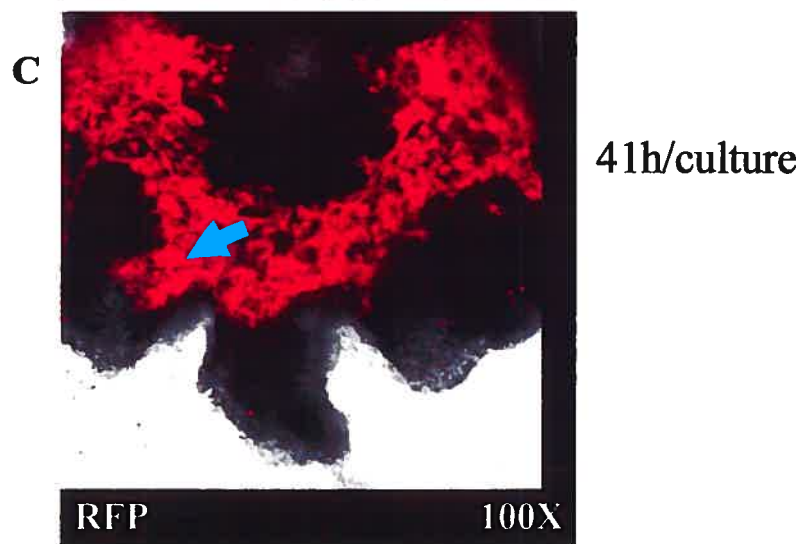
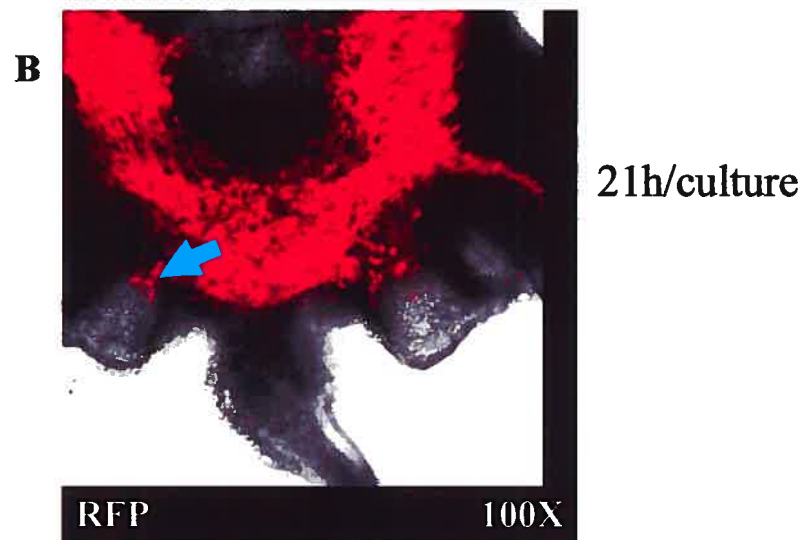
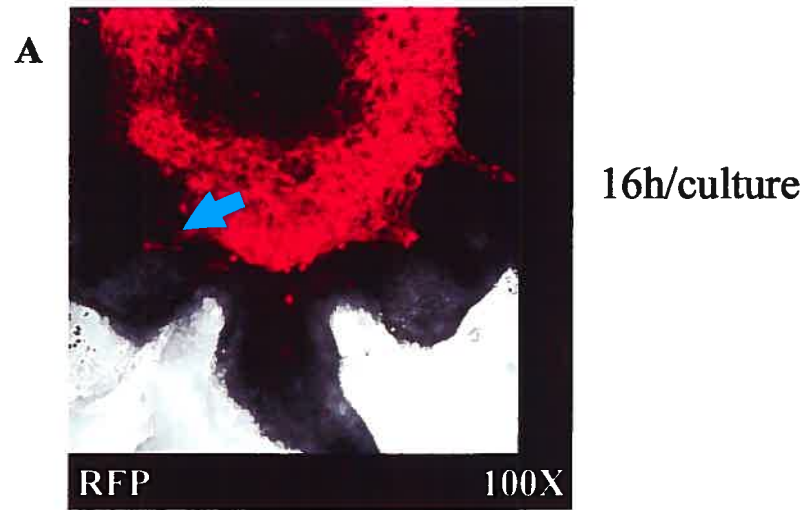
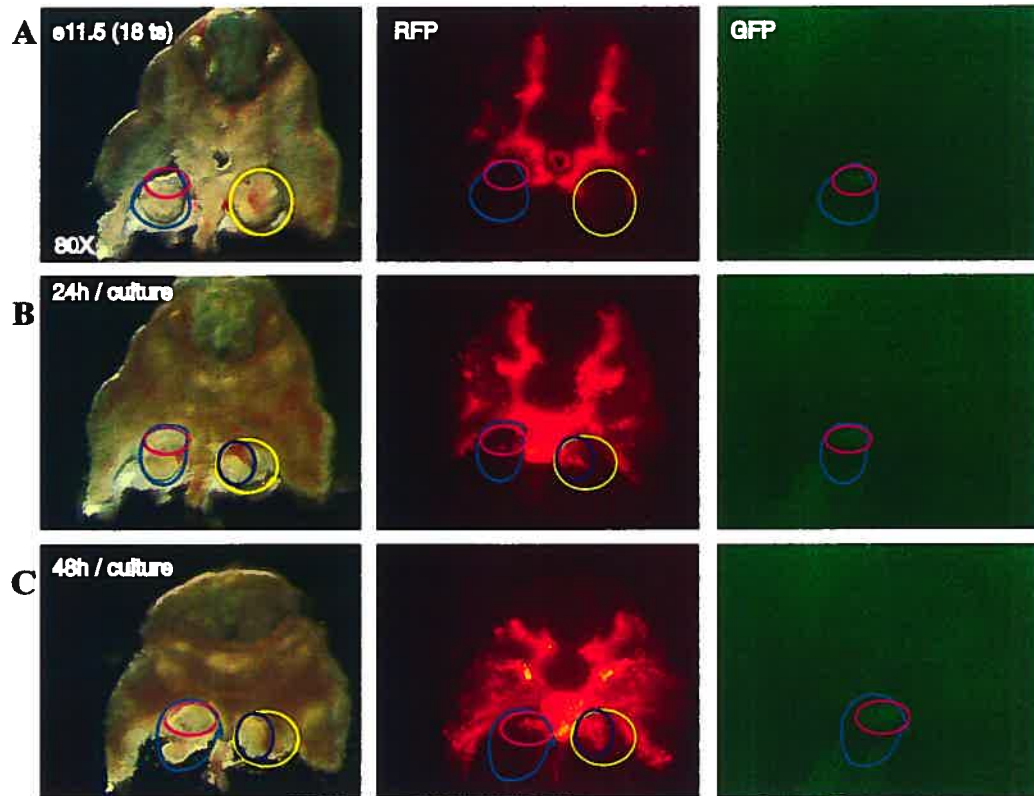


Figure 5.2 Étude de transplantation. Transplantation d'une crête urogénitale mâle d'un embryon mOCT4p-GFP de 15ts dans une tranche d'embryon mâle rGATA4(5.0Kb)p-RFP de 18ts en culture. Observé au microscope optique (80X) à a) 0h de culture. b) 24h de culture. c) 48h de culture.







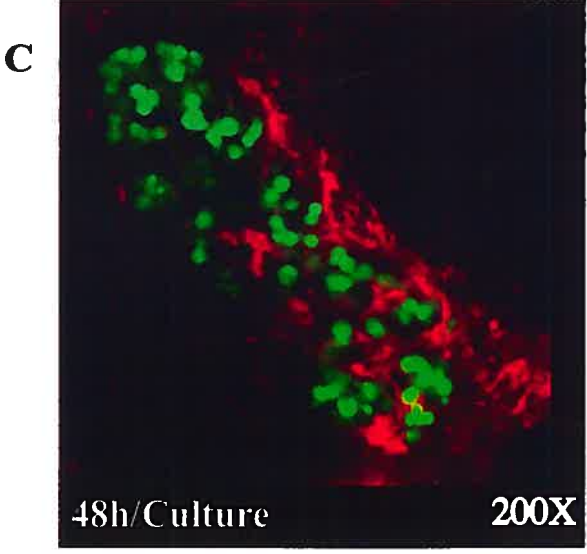
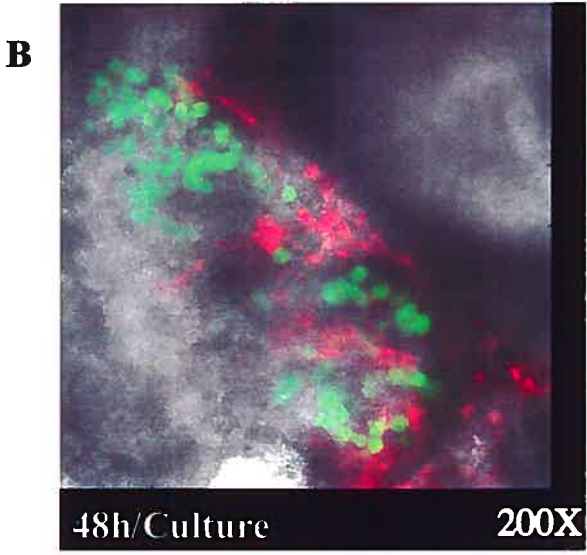
-  Crête urogénitale transplantée embryon mOct4p-GFP
-  Gonade transplantée embryon mOct4p-GFP
-  Crête urogénitale embryon rGata4(5.0Kb)p-RFP
-  Gonade embryon rGata4(5.0Kb)p-RFP

Figure 5.3 Étude de transplantation 2. Observation à 200X au microscope confocal de l'infiltration des cellules fluorescentes rouge d'une tranche d'embryons mâle en culture rGATA4(5.0kb)-RFP de 16ts dans une gonade mâle transplantée d'un embryon mOCT4p-GFP de 15ts après 48h de culture. **a)** lumière visible. **b)** lumière visible et fluorescence. **c)** fluorescence.



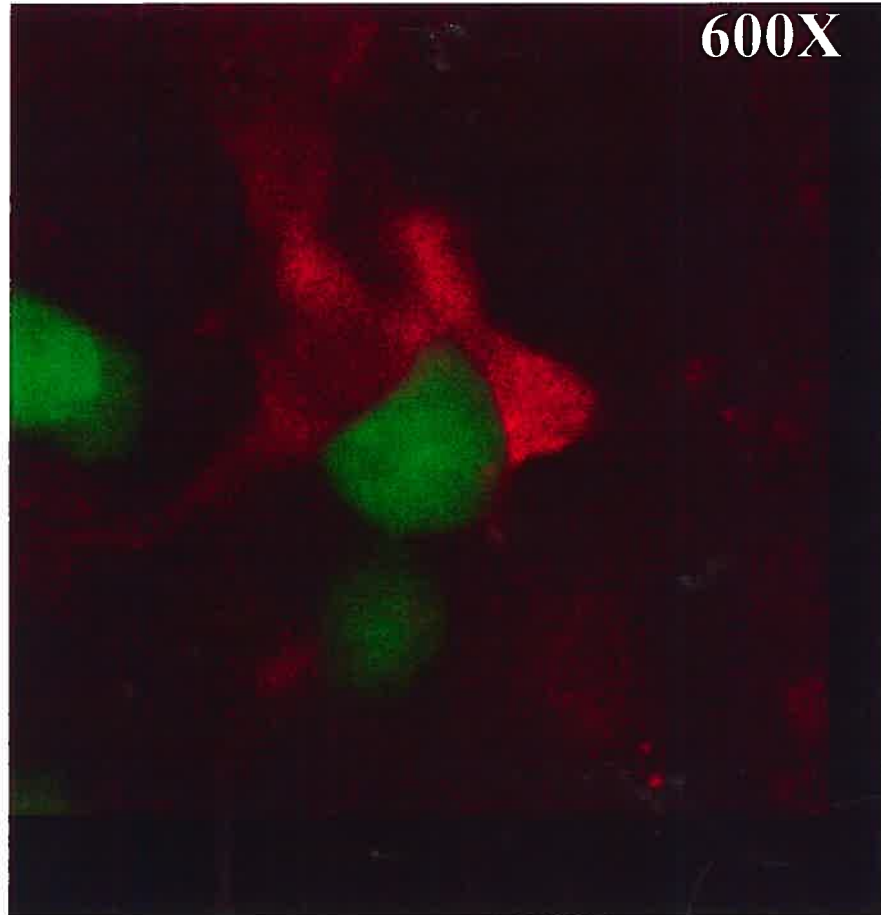
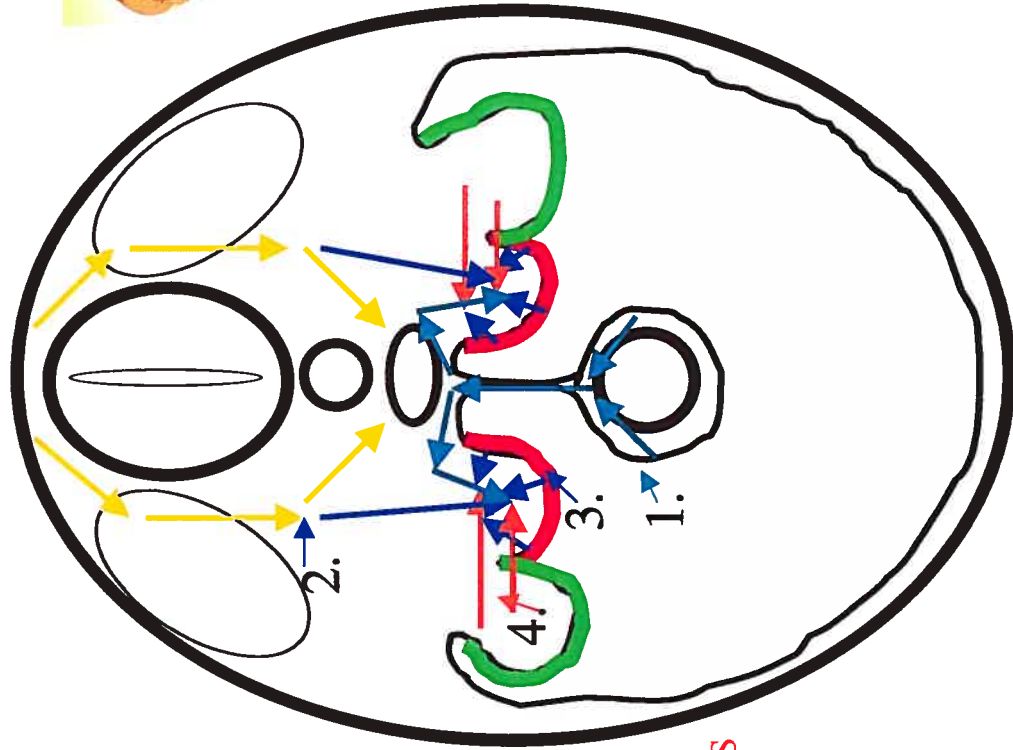


Figure 5.4 Étude de transplantation. Observation à 600X au microscope confocal de l'infiltration des cellules fluorescentes rouge d'une tranche d'embryon femelle en culture rGATA4(5.0Kb)p-RFP de 18 ts dans une gonade mâle transplantée d'un embryon mOCT4p-GFP de 15 ts après 48 heures de culture

Figure 5.5 Nouvelle hypothèse du modèle de la formation d'un testicule chez les mammifères euthériens. **1)** Migration des cellules germinales à partir du mésoderme extraembryonnaire du feuillet amniotique postérieur. **2)** Migration d'une sous-population des cellules pré-Sertoli à partir de la crête neurale. **3)** Recrutement d'une sous-population des cellules pré-Sertoli provenant de l'épithélium coelomique. **4)** Migration des cellules de Leydig, cellules endothéliales et myoépithéliales du mésonephros.



Cellules germinales

Cellules de Sertoli

Cellules de Leydig

Cellules endothéliales

Cellules Myoépithéliales

5.4 UTILISATION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES COMME OUTIL BIOLOGIQUE

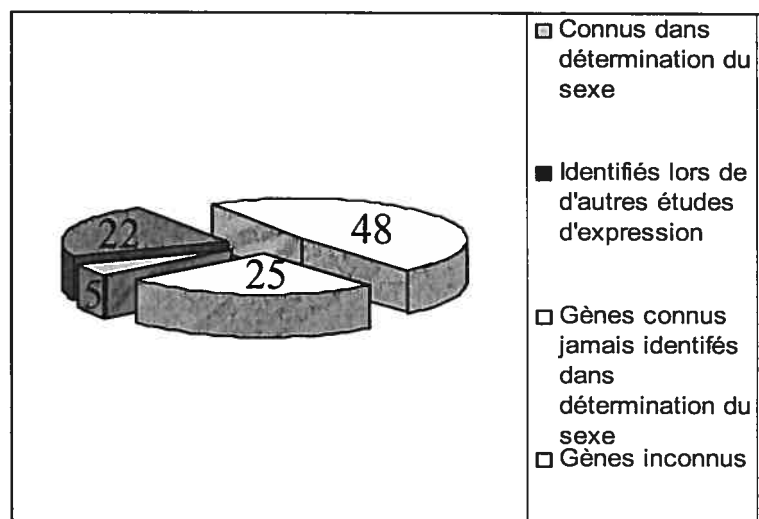
En plus des études évolutives des promoteurs *in vivo*, nos modèles de souris transgéniques peuvent être utilisés comme outils pour purifier et récupérer différentes populations de cellules exprimant nos marqueurs fluorescents permettant ainsi d'effectuer des études d'expression différentielle, de mettre en culture et d'immortaliser des cellules pré-Sertoli et, avec la lignée exprimant la recombinaise Cre, d'effectuer des KO tissus spécifiques de gènes particuliers dans les testicules en développement.

5.4.1 ÉTUDES D'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE

La vaste majorité des gènes impliqués dans les processus de la détermination et la différenciation ont été identifiés suite à des études sur des patients humains démontrant des anomalies congénitales du système urogénitale ou encore à la suite d'études sur des souris KO créées pour étudier d'autres systèmes. Ces dernières années, de nombreux groupes de recherche ont effectué des études de criblage différentiel en comparant les gènes exprimés dans les testicules et ceux exprimés dans les ovaires (McClive et coll., 2003; Bowles et coll., 2000b; Nordqvist et Töhönen, 1997; Wertz et Hermann, 2000; Menke et Page, 2002; Smith et coll., 2003b; Small et coll., 2005). Quoique ces études démontrent de légères différences dans la méthodologie utilisée, elles comparent dans leur ensemble les testicules et les ovaires sur le plan tissulaire plutôt que cellulaire. Nos modèles de souris permettent toute fois d'effectuer le même genre d'études au plan cellulaire. Une de ces études a été effectuée en comparant les cellules de pré-Sertoli avec les autres types cellulaires (Boyer et coll., 2004) présents dans le testicule au moment de la détermination du sexe. L'hypothèse de cette étude sous-tendait que les gènes clefs pour la détermination du sexe seraient exprimés dans les cellules pré-Sertoli suite à l'expression de *Sry* (Chapitre IV).

Une seconde expérience compare les cellules de pré-Sertoli avec les crêtes génitales femelles. Cette seconde étude (répétée quatre fois) complémentaire à la première a été effectuée en purifiant 25 000 cellules fluorescentes de testicules et 25 000 cellules non-fluorescentes d'ovaires d'embryons transgéniques pSRYHyb-RFP (préalablement décrits) au jour e12.0. L'ARN total (10µg) a été utilisé pour fabriquer les sondes après deux rondes d'amplification par PCR. Les puces d'Affimetrix mouse430_2 ont été utilisées pour l'hybridation selon le protocole effectué par le Génome Québec Innovation Center de l'Université McGill. Une telle expérience donne un profil d'expression beaucoup plus complet que ce qui est observé pour le dot blot mais n'était pas applicable préalablement à cause de la limite du système pour la quantité d'ARN nécessaire à l'hybridation. Les résultats obtenus pour les cents gènes les plus exprimés dans les cellules pré-Sertoli sont schématisés à la figure 5.6. Très peu de redondance est identifiable entre les deux études effectuées. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces deux études ne comparaient pas les mêmes populations cellulaires mais pourrait également s'expliquer par le nombre restreint de gènes étudiés par macro-réseau par rapport au nombre de gènes étudiés à l'aide des puces à ADN. Par contre, il est important de mentionner que lorsque l'ensemble des résultats de deux ou plusieurs études de différents laboratoires ont été comparés, moins de 50% des gènes identifiés se retrouvaient dans les deux études (Sinclair et Koopman résultats non publiés) démontrant que les testicules sont fortement remodelés à ce moment du développement et démontrant aussi une forte complexité d'expression des gènes. Peu importe la technique utilisée pour effectuer les études d'expression différentielle, ces dernières vont générer un nombre très élevé de gènes candidats mais également un fort pourcentage de faux négatifs d'où l'importance de bien sélectionner les candidats à partir de cette liste et de valider ces résultats par une autre technique comme le WISH.

A)



B)

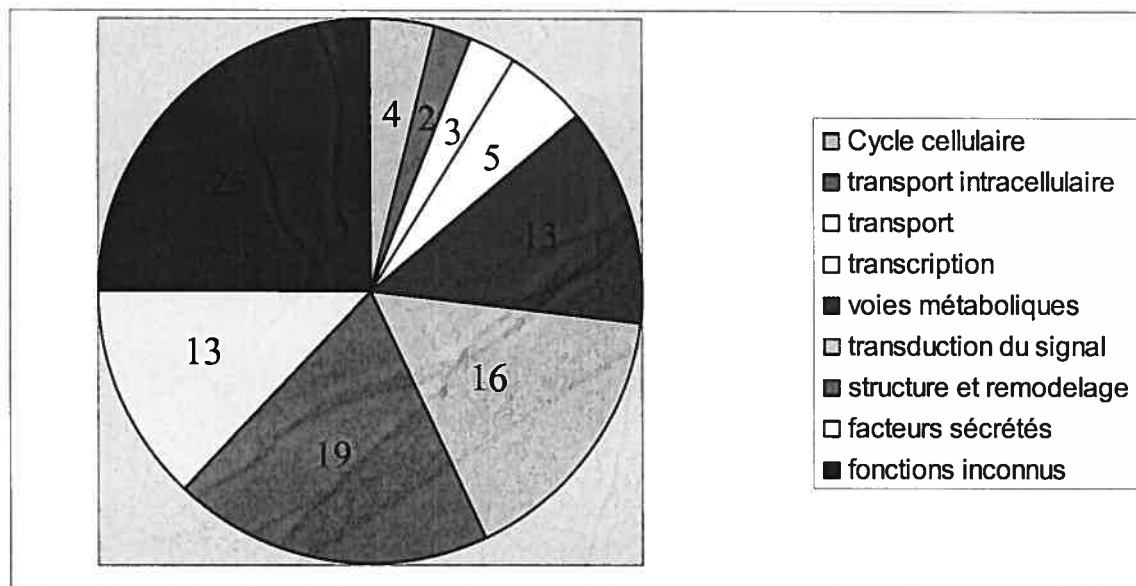


Figure 5.6 Identification des 100 gènes démontrant la plus grande surexpression dans les cellules pré-Sertoli par comparaison avec les ovaires lors de l'étude d'expression différentielle effectuée avec les puces Affymetrix mouse430_2 **a)** Comparaison avec les autres études d'expression différentielle. **b)** Classement selon leur fonction cellulaire

Gènes connus dans le domaine et parmi les 100 gènes les plus fortement exprimés dans les cellules fluorescentes	
Amh	Anti-mullerian hormone
Sox9	Sry-box containing gene 9
Vnn1	Vanin 1
Fgf9	Fibroblast growth factor 9
Dhh	Desert hedgehog
Gènes préalablement identifiés lors de d'autres études d'expression différentielle parmi les 100 gènes les plus fortement exprimés dans les cellules fluorescentes	
Col9a3	Procollagen type IX A3
Ddx3y	DEAD box polypeptide 3 Y-linked
Eif2s3y	Translation initiation factor subunit3 structural gene Y-linked
Ptgds	Prostaglandin D2 synthase
Mmd2	Monocyte to macrophage differentiation associated-2
Tdl	Testis specific beta defensin like
Serpina5	Serine proteinase inhibitor clasA member5
Dtna	Dystrobrevin alpha
Col2a1	Procollagen type II A1
Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase family 1 subfamily a1
Serpine2	Serine proteinase inhibitor clasE member2
Pak3	P21 activated kinase 3
Gstm6	Glutathione S-transferase mu 6
Smcy	Selected mouse cDNA on the Y
Hsd3b1	Hydroxysteroid dehydrogenase-1 delta (5)3-beta
Cbln4	Cerebellin precursor 4 protein
2310045A20Rik	Riken cDNA 2310045A20
Ppt1	Palmytoil-protein thioesterase 1
Ren1	Renin 1
Cyp26B1	Cytochrome P450 family 26 subfamily B polypeptide 1
Hao3	Hydroxyacid oxydase 3
Gpr49	G-protein coupled receptor 49

Tableau 5.1 Liste des gènes impliqués ou potentiellement impliqués préalablement dans les processus de la détermination et de la différenciation du sexe parmi les 100 gènes les plus exprimés.

5.4.2 PERSPECTIVES

En premier lieu, les études de WISH seront poursuivies afin d'étudier plus en détails les gènes candidats potentiellement impliqués dans la détermination du sexe. Les gènes candidats seront choisis dans nos listes de gènes identifiés par les études d'expression différentielle selon trois critères : les facteurs connus pour être impliqués lors du développement, et selon notre hypothèse préalablement décrite, les facteurs impliqués durant la migration et les facteurs impliqués lors de l'apoptose.

Ensuite, grâce à l'avantage des souris transgéniques exprimant des marqueurs de fluorescence qui, contrairement aux souris transgéniques utilisant LacZ comme gène rapporteur, permettent de vérifier l'expression des marqueurs sans tuer les cellules. Ceci permet ainsi, après la séparation par FACS des cellules fluorescentes, de mettre ces cellules en culture pour ainsi effectuer différentes études comme des études d'expression ou de précipitation de la chromatine. Les tissus demeurant vivants, il est également possible de regarder l'effet de divers facteurs paracrines sur ces tissus ou sur la migration des cellules dans les tissus. De nouvelles études d'expression différentielle seront entreprises en comparant les cellules pré-Sertoli aux cellules germinales et aux autres types cellulaires du testicule en développement et en comparant les cellules pré-Sertoli aux cellules pré-granulosa.

Finalement, des études de KO conditionnel dans les cellules pré-Sertoli peuvent être effectuées en croisant notre lignée de souris pDMRT1p-Cre avec des souris ayant des sites flox. Cette même technique pourra également être utilisée pour générer des souris qui exprimeront des protéines tronquées interférant avec une protéine d'intérêt comme Gata4 pour effectuer des études de knock-down.

5.5 CONCLUSION

Bien que *SRY* ait été identifié il y a maintenant 15 ans, l'analyse des processus de la détermination et de la différenciation du sexe demeure incomplète. Nos modèles de souris transgéniques exprimant les promoteurs humains et porcins sont particulièrement importants afin d'établir les liens entre les études effectuées chez la souris et celles chez l'humain. Ainsi, grâce à nos études, il est maintenant possible d'affirmer que non seulement lorsque les séquences promotrices d'un gène sont fortement conservées (*DMRT1*) mais également lorsque ces séquences sont très peu conservées (*SRY*) le contrôle de ces gènes dans un système hétérologue est similaire à celui observé chez le mammifère supérieur et la souris. Malgré tout, de légères différences subsistent pour le contrôle de *SRY* et la souris pourrait représenter l'exception plutôt que le modèle pour la détermination du sexe chez les mammifères euthériens. Une nouvelle observation pour la première fois identifier dans ces travaux est le lien potentiel entre les cellules de la crête neurale et la crête génitale. Grâce à un nouveau système de culture d'embryons, de transplantation et à nos modèles de souris hétérologues nous avons proposé une nouvelle étape au modèle dogmatique de la formation des testicules; c'est-à-dire la migration d'une sous-population des cellules pré-Sertoli à partir de la crête neurale. Finalement, ces souris transgéniques s'avèrent extrêmement efficaces pour récupérer et purifier les cellules pré-Sertoli et ainsi les étudier plus facilement. Ainsi, pour la première fois, un patron complet des gènes exprimés dans les cellules pré-Sertoli lors de la détermination du sexe est maintenant accessible permettant d'identifier de nouveaux gènes candidats impliqués dans les processus de la détermination et la différenciation du sexe. Les études réalisées dans cette thèse doctorale suggèrent que plusieurs modèles sont nécessaires afin de réellement comprendre un système aussi complexe.

5.6 CONTRIBUTIONS À CETTE THÈSE

Les souris transgéniques décrites dans cette thèse ont été fabriquées par Dr David W. Silversides, madame Céline Forget et madame Isabelle Daneau. De plus, les constructions pour les promoteurs *Sry* humain et porcin ont été effectuées par madame Céline Forget.

CHAPITRE 6

Bibliographie

RÉFÉRENCES

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H. (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet.* 12(1):106-9.

Achermann JC, 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.

Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun UA, Harmanci K, Gurakan B, Jameson JL. (2002) Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(4):1829-33.

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

Albrecht KH, Eicher EM. (2001) Evidence that SRY is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and Granulosa cells have a common precursor. *Dev. Bio.* 240: 92-107.

Anttonen M, Ketola I, Parviainen H, Pusa AK, Heikinheimo M. (2003) FOG-2 and GATA-4 Are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression. *Biol Reprod.* 68(4):1333-40.

Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99(4): 409-419.

Baker BS, Ridge KA. (1980) Sex and the single cell.I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 94: 383-423.

Baird PN, Groves N, Haber DA, Housman DE, Cowell JK. (1992) Identification of mutations in the *WT1* gene in tumors from patients with the WAGR syndrome. *Oncogene* 7: 2141-2149.

Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K.(1997) Donor splice-site mutations in *WT1* are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet.* 17:467-70.

Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley K. (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. Genet.* 7: 497-501.

Behlke MA, Bogan JS, Beer-Romero P, Page DC. (1993) Evidence that the *SRY* protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics* 17: 736-739.

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

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. (1997) *SOX9* directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.* 16: 174-178.

Bergstrom DE, Young M, Albrecht KH, Eicher EM. (2000) Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis* 28: 111-24.

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

Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA. (2000a) A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet.* 26: 490-4.

Blanchard MG, Josso N.(1974) Source of the anti-Mullerian hormone synthesized by the fetal testis: Mullerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatr Res.* 8:968-71.

Bland ML, Jamieson CA, Akana SF, Bornstein SR, Eisenhofer G, Dallman MF, Ingraham HA. (2000) Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:14488-93.

Bogatcheva NV, Agoulnik AI. (2005) *INSL3/LGR8* role in testicular descent and cryptorchidism. *Reprod Biomed Online.* 10:49-54.

Bowles J, Cooper L, Berkman J, Koopman P. (1999) *Sry* requires a CAG repeat domain for male sex determination in *Mus musculus*. *Nat Genet.* 22:405-8.

Bowles J, Schepers G, Koopman P. (2000a) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol.* 227:239-55.

Bowles J, Bullejos M, Koopman P. (2000b) A subtractive gene expression screen suggests a role for vanin-1 in testis development in mice. *Genesis*. 27:124-35.

Boyer A, Lussier J, Sinclair A, McClive P, Silversides DW. (2004) Pre-Sertoli specific gene expression reveals differential expression of *Ppt1* and *Brd3* genes within the mouse genital ridge at the time of sex determination. *Biology of Reproduction*. 71: 820-827.

Brennan J, Karl J, Capel B. (2002) Divergent vascular mechanisms downstream of SRY establish the arterial system in the XY gonad. *Dev. Biology* 244: 418-429.

Brennan J, Tilmann C, Capel B. (2003) Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev*. 17:800-10.

Bridges C. (1921) Triploid intersexes in *D. melanogaster*. *Science*. NS: 252-254.

Brunelli S, Silva Casey E, Bell D, Harland R, Lovell-Badge R. (2003) Expression of *Sox3* throughout the developing central nervous system is dependent on the combined action of discrete, evolutionarily conserved regulatory elements. *Genesis* 36:12-24.

Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE. (1991) Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (*WT1*) during kidney development. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1707-1712.

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

Bullejos M, Bowles J, Koopman P. (2001a) Searching for missing pieces of the sex-determination puzzle. *J. Exp. Zool.* 290: 517-22.

Bullejos M, Koopman P. (2001b) Spatially dynamic expression of SRY in mouse urogenital ridges. *Dev. Dynam.* 221: 201-205.

Bullejos M, Koopman P. (2004) Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Mol Reprod Dev.* 68:422-8.

Burgoyne PS, Buehr M, McLaren A. (1988) XY follicle cells in ovaries of XX----XY female mouse chimaeras. *Development.* 104:683-8.

Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, et al. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms'tumor locus. *Cell* 60: 509-20.

Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1993) Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* 73: 1019-1030.

Capel B, Albreicht KH, Washburn LL, Eicher EM. (1999) Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on SRY. *Mech. Dev.* 84: 127-131.

Carré Eusèbe D, di Clemente N, Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N, Picard J-Y. (1996) Cloning and expression of the chick anti müllerian hormone gene. *J. Biol. Chem.* 271: 4798-4804.

Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A. (2004) Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development.* 131:1891-901.

Charlesworth B. (2003) Sex determination in the honeybee. *Cell.* 114:397-8.

Chen JK, Heckert LL. 2001. Dmrt1 expression is regulated by follicle-stimulating hormone and phorbol esters in postnatal Sertoli cells. *Endocrinology* 142:1167-78.

Cheung M, Briscoe J. (2003) Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development*. 130:5681-93.

Clemens JW, Lala DS, Parker KL, Richards JS. (1994) Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134: 1499-1508.

Clépet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovelle-Badge R, Goodfellow PN. (1993) The human SRY transcript. *Hum. Mol. Genet.* 2: 2007-2012.

Cline TW et Meyer BJ. (1996) Vive la difference: males vs females in flies vs worms. *Annu. Rev. Genet.* 30: 637-702.

Clinton M, Haines LC. (2001) An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. *EXS* 91:97-115.

Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, 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 JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. (2001) Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104: 875-89.

Correa RV, Domenice S, Bingham NC, Billerbeck AE, Rainey WE, Parker KL, Mendonca BB. (2004) A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:1767-72.

Daneau I, Houde A, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW. (1995) Bovine SRY gene locus : cloning and testicular expression. *Biol. Reprod.* 52: 591-599.

Daneau I, Pilon N, Boyer A, Behdjani R, Overbeek PA, Viger R, Lussier J, Silversides DW. (2002) The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis* 33: 170-180.

DeFalco TJ, Verney G, Jenkins AB, McCaffery JM, Russell S, Van Doren M. (2003) Sex-specific apoptosis regulates sexual dimorphism in the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev Cell* 5:205-16.

De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Descloseaux 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.

De Santa Barbara P, Méjean C, Moniot B, Maclès M-H, Berta P, Boizet-Bonhoure B. (2001) Steroidogenic factor 1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol. Reprod.* 64: 775-783.

Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Soullier S, Jay P, Berta P, Boizet-Bonhoure B. (1998) Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining SRY promoter. *Biochim. Biophys. Acta.* 1397: 247-252.

Dolci S, Grimaldi P, Geremia R, Pesce M, Rossi P. (1997) Identification of a promoter region generating Sry circular transcripts both in germ cells from male adult mice and in male mouse embryonal gonads. *Biol Reprod.* 57: 1128-1135.

Donahoe PK, Ito Y, Price JM, Hendren WH 3rd. (1977) Mullerian inhibiting substance activity in bovine fetal, newborn and prepubertal testes. *Biol Reprod.* 16:238-43.

Donahoe PK, Cate RL, MacLaughlin DT, Epstein J, Fuller AF, Takahashi M, Coughlin JP, Ninfa EG, Taylor LA.(1987) Mullerian inhibiting substance: gene structure and mechanism of action of a fetal regressor. *Recent Prog Horm Res.* 43:431-67

Dubin R, Ostrer H. (1994) Sry is a transcriptional activator. *Mol. Endocrinol.* 8: 1182-1192.

Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge Y, Ezzell R et al. (1995) Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild type protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11960-11964.

Fernandez AM, Kim JK, Yakar S, Dupont J, Hernandez-Sanchez C, Castle AL, Filmore J, Shulman GI, Le Roith D. (2001) Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev.* 15:1926-34.

Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. (1992) SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* 11: 4497-4506.

Flejter WL, 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.

Foster JW, Graves JA. (1994) An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome : implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1927-1931.

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

Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JA. (1992) Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature.* 359:531-3.

Francis RC, Soma K, Fernald RD. (1993) Social regulation of the brain-pituitary-gonadal axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7791-7798.

Gessler M, Konig A, Moore J, Qualman S, Arden K, Cavenee W, Bruns G. (1993) Homozygous inactivation of WT1 in a Wilms' tumor associated with the WAGR syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 7:131-6.

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110: 521-528.

Graves JA. (1991) Mammalian genome evolution: new clues from comparisons of eutherians, marsupials and monotremes. *Comp Biochem Physiol A.* 99:5-11.

Graves JA. (2001) From brain determination to testis determination: evolution of the mammalian sex-determining gene. *Reprod Fertil Dev.* 13:665-72.

Graves JA. (2002) The rise and fall of SRY. *Trends Genet.* 18:259-64.

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* 272:662-6.

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. USA* 89: 7953-7957.

Guioli S, Schmitt K, Critcher R, Bouzyk M, Spurr NK, Ogata T, Hoo JJ, Pinsky L, Gimelli G, Pasztor L, Goodfellow PN. (1998) Molecular analysis of 9p deletions associated with XY sex reversal : refining the localization of a sex-determining gene to the tip of the chromosome. *Am. J. Genet.* 63: 905-908.

Guo W, Mason JS, Stone CG Jr, Morgan SA, Madu SI, Baldini A, Lindsay EA, Biesecker LG, Copeland KC, Horlick MN, et al. (1995) Diagnosis of X-linked adrenal hypoplasia congenita by mutation analysis of the DAX1 gene. *JAMA* 274:324-30.

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1995) Expression of SRY, the mouse sex determining gene. *Development* 121: 1603-1614.

Haqq CM, Donahoe PK. (1998) Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol. Rev.* 78: 1-33.

Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, 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 NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI. (2000) SRY, SOX9, and Dax-1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* 91: 403-407.

Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1994) Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acid Res.* 22: 1500-1501.

Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN, Hextall PJ. (1996) The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett.* 391: 24-28.

Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. (2003) 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.* 24:466-87.

Harry JL, Koopman P, Brennan FE, Graves JA, Renfree MB. (1995) Widespread expression of the testis-determining gene SRY in a marsupial. *Nat Genet.*: 11:347-9.

Hawkins, J. R., Taylor, A., Berta, P., Levilliers, J., van Der Auwere, B. and Goodfellow, P. N. (1992). Mutational analysis of *SRY*: Nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum. Genet.* 88: 471 -474.

Heikinheimo M, Ermolaeva M, Bielinska M, Rahman NA, Narita N, Huhtaniemi IT, Tapanainen JS, Wilson DB. (1997) Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology.* 138:3505-14.

Hirai M, Ono K, Morimoto T, Kawamura T, Wada H, Kita T, Hasegawa K. (2004) FOG-2 competes with GATA-4 for transcriptional coactivator p300 and represses hypertrophic responses in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 279:37640-50.

Hiraoka Y, Ogawa M, Sakai Y, Taniguchi K, Fujii T, Umezawa A, Hata J, Aiso S. (1998) Isolation and expression of a human SRY-related cDNA hSOX20. *Biochim Biophys Acta.* 1396:132-7.

Ho J, Zhang YH, Huang BL, McCabe ER. (2004) NR0B1A: an alternatively spliced form of NR0B1. *Mol Genet Metab.*83:330-6.

Hobert O, Westphal H. (2000) Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* 16:75-83.

Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. (1994) Manipulating the mouse embryo, ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Holmes M, Turner J, Fox A, Chisholm O, Crossley M, Chong B. (1999) hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *J Biol Chem.* 274:23491-8.

Hossain A, Saunders GF. (2001) The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J. Biol. Chem.* 276: 16817-16823.

Hossain A, Saunders GF. (2003) Role of Wilms tumor 1 (WT1) in the transcriptional regulation of the Mullerian-inhibiting substance promoter. *Biol Reprod.* 69:1808-14.

Hossain A, Saunders GF. (2004) Generation of two distinct functional isoforms of dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X chromosome gene 1 (DAX-1) by alternative splicing. *Mol Endocrinol.* 18:1428-37.

Huang B Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley T. (1999) Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am. J. Med. Genet.* 87: 349-353.

Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. (1993) The murine *steel panda* mutation affects *kit* ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev. Biol.* 157: 100-109.

Ikeda Y, Shen W-H, Ingraham H, Parker K. (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8: 654-662.

Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. (1995) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* 9: 478-486.

Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai KT, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL. (1996) Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages : potential links in endocrine development. *Mol. Endocrinol.* 10: 1261-1272.

Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Morohashi KI. (2001) Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn.* 220:363-76.

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.

Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T, Nasu K, et al. (1994) WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood.* 84:3071-9.

Ishikawa T, Tamai Y, Zorn AM, Yoshida H, Seldin MF, Nishikawa S, Taketo MM.(2001) Mouse Wnt receptor gene *Fzd5* is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development.* 128:25-33.

Ito M, Yu R, Jameson JL. (1997) DAX-1 inhibits SF-1 mediated transactivation via a carboxyl-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1476-1483.

Jacobsen CM, Narita N, Bielinska M, Syder AJ, Gordon JI, Wilson DB. (2002) Genetic mosaic analysis reveals that GATA-4 is required for proper differentiation of mouse gastric epithelium. *Dev. Biol.* 241: 34-46.

Jans DA, Xiao CY, Lam MH. (2000) Nuclear targeting signal recognition : a key control point in nuclear transport? *BioEssays* 22: 532-544.

Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B. (2003) Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by Wnt-4 in the developing mammalian gonad. *Development* 130: 3663-3670.

Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A. (2004) Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol.* 276:431-40.

Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, Zhao L, De Rooij DG, Themmen AP, Behringer RR, Parker KL. (2004) Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol.* 18:1610-9.

Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, Dewing P et al. (2001) Up-regulation of Wnt-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1102-1109.

Jordan BK, Shen JH, Olaso R, Ingraham HA, 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.* 100:10866-71.

Jost A. (1947) Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 36: 271-315.

Kamachi Y, Uchikawa M, Kandoh H. (2000) Pairing of SOX off: partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* 16: 182-187.

Karl J, Capel B. (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 203: 323-333.

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.* 393:688-92.

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.

Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 2813-2822.

Kim J, Prawitt D, Bardeesy N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, Zabel B, Pelletier J. (1999) The Wilm's tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2289-2299.

Kim S, Kettlewell JR, Anderson RC, Bardwell VJ, Zarkower D. (2003) Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Exp. Pat.* 3: 77-82.

Kitamura T, Kido Y, Nef S, Merenmies J, Parada LF, Accili D. (2001) Preserved pancreatic beta-cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor. *Mol Cell Biol.* 21:5624-30.

Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P, Gessler M. (1998) Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet.* 7:709-14.

Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. (2004) Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. *Development.* 131:539-49.

Koopman P, Gubbay J, Collignon J, Lovell-Badge R. (1989) Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature.* 342:940-2.

Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R.(1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 348:450-2.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovelle-Badge R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 351: 117-121.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. (1993) WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74: 679-691.

Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Pharmacek MS, Soudais C, Leidan JM. (1997) GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 11: 1048-1060.

Ladomery MR, Slight J, MC GS, Hastie ND. (1999) Presence of the WT1, the Wilm's tumor suppressor gene product, in nuclear poly (A)(+) ribonucleoprotein. *J. Biol. Chem.* 274: 36520-36526.

Lalli E, Ohe K, Hindelang C, Sassone-Corsi P. (2000) Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. *Mol Cell Biol.* 20:4910-21.

Lalli E, Ohe K, Latorre E, Bianchi ME, Sassone-Corsi P. (2003) Sexy splicing : regulatory interplays governing sex determination from *Drosophila* to mammals. *J. Cell Sci.* 116: 441-445.

Langman J, Sadler TW. (1996) *Embryologie médicale.* 6^{ième} édition. Éditions Pradel. Paris.

Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, et al. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81: 391-401.

Lee HJ, Goring W, Ochs M, Muhlfeld C, Steding G, Paprotta I, Engel W, Adham IM. (2004) Sox15 is required for skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol.* 24:8428-36.

Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH. (1997) Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem.* 272:7960-7.

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, De Crombrughe B. (1997) SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro-alpha-1 (II) collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2336-2346.

Lehmann SG, Lalli E, Sassone-Corsi P. (2002) X-linked adrenal hypoplasia congenita is caused by abnormal nuclear localization of the DAX-1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:8225-30.

Lei N, Heckert LL. (2004) Gata4 regulates testis expression of Dmrt1. *Mol Cell Biol.* 24:377-88.

Lewis EB. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature.* 276:565-70.

Lim HN, Berkovitz GD, Hughes IA, Hawkins JR. (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.* 107:650-2.

Liu ZZ, Wada J, Alvares K, Kumar A, Wallner EI, Kanwar YS. (1993) Distribution and relevance of insulin-like growth factor-I receptor in metanephric development. *Kidney Int.* 44:1242-50.

Lovell-Badge R, Robertson E. (1990) XY female mice resulting from an heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development* 109: 635-646.

Lovell-Badge R, Canning C, Sekido R. (2002) Sex-determining genes in mice: building pathways. *Novartis Found Symp.* 244:4-18; discussion 18-22, 35-42, 253-7.

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.

Madl JE et Herman RK. (1979) Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 93: 393-402.

Malik S, Guermah M, Roeder RG. (1998) A dynamic model for PC4 coactivator function in RNA polymerase II transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2192-2197.

Margarit E, Guillen A, Rebordosa C, Vidal-Taboada J, Sanchez M, Ballesta F, Oliva R. (1998) Identification of conserved potentially regulatory sequences of the SRY gene from 10 different species of mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 370-377.

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.

Matoba S, Kanai Y, Kidokoro T, Kanai-Azuma M, Kawakami H, Hayashi Y, Kurohmaru M. (2005) A novel Sry-downstream cellular event which preserves the

readily available energy source of glycogen in mouse sex differentiation. *J Cell Sci.* 118:1449-59.

Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature.* 417:559-63.

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.* 22:7900-4.

Mayer A, Lahr G, Swaab DF, Pilgrim C, Reisert I. (1998) The Y-chromosomal genes SRY and ZFY are transcribed in adult human brain. *Neurogenetics.* 1:281-8.

Mayer A, Mosler G, Just W, Pilgrim C, Reisert I. (2000) Developmental profile of Sry transcripts in the brain. *Neuro. Genet.* 3: 25-30.

McClive PJ, Hurley TM, Sarraj MA, van den Bergen JA, Sinclair AH.(2003) Subtractive hybridisation screen identifies sexually dimorphic gene expression in the embryonic mouse gonad. *Genesis.* 37:84-90.

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.* 90:3368-72.

McLaren A.(1984) Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol.* 38:7-23.

McLaren A, Simpson E, Epplen JT, Studer R, Koopman P, Evans EP, Burgoyne PS. (1988) Location of the genes controlling H-Y antigen expression and testis determination on the mouse Y chromosome. *Proc Natl Acad USA.* 85: 6442-6445.

McLaren A. (2000) Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163: 3-9.

Meeks JJ, Weiss J, Jameson JL. (2003) Dax1 is required for testis determination. *Nat. Genet.* 34: 32-33.

Meng A, Moore B, Tang H, Yuang B, Lin S. (1999) A Drosophila doublesex-related gene, terra, is involved in somatogenesis in vertebrates. *Development* 126 :1259-1268.

Menke DB, Page DC. (2002) Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns.* 2:359-67.

Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M. (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Intl. J. Dev. Biol.* 37: 407-415.

Meyers-Wallen VN. (2003) Sry and Sox9 expression during canine gonadal sex determination assayed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Reprod Dev.* 65:373-81.

Mistelli T. (2002) Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell. Sci.* 113: 1841-1849.

Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. (1997) Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development*. 124:1653-64.

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.

Molkentin JD. (2000) The zinc finger-containing transcription factors *GATA-4,-5,-6*. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 275: 38949-38952.

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. (1997) Requirement of the transcription factor *GATA4* for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 11: 1061-1072.

Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ. (1996) Targeted disruption of the *Wnt2* gene results in placentation defects. *Development*. 122:3343-53.

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.

Morohashi K, Iida H, Nomura M, Hatano O, Honda S, Tsukiyama T, Niwa O, Hara T, Takakusu A, Shibata Y, et al. (1994) Functional difference between *Ad4BP* and *ELP*, and their distributions in steroidogenic tissues. *Mol. Endocrinol.* 8: 643-653.

Morrish BC, Sinclair AH. (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124:447-57.

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.

Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. (1998) Wilm's tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93: 445-454.

Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF. (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*. 426:291-5.

Nordqvist K. (1995) Sex differentiation-gonadogenesis and novel genes. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 727-736.

Nordqvist K, Töhönen V. (1997) An mRNA differential display strategy for cloning genes expressed during mouse gonad development. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 627-638.

Ogata T, Hawkins J, Taylor A, Matsuo N, Hata J-I, Goodfellow P. (1992) Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype : support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation. *J. Med. Genet.* 29: 226-230.

Ohe K, Lalli E, Sassone-Corsi P. (2002) A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1146-1151.

Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S, Yao M, Takahashi E, Nakano Y, Hirabayashi H, Shintani Y, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Asada M, Fujioka T, Murakami M, Kanato K, Motomura M, Kim EH, Kawakami M, Ikegame K, Ogawa H, Aozasa K, Kawase I, Sugiyama H. (2002) Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer*. 100:297-303.

Orkin SH. (2000) Diversification of hematopoietic cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1: 57-64.

Orlando V, Paro R. (1993) Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell*. 75:1187-98.

Ornitz DM, Itoh N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2, 3005.1-3005.12.

Osaki E, Nishina Y, Inazawa J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ohsugi M, Tezuka T, Yoshida M, Semba K. (1999) Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res.* 27:2503-10.

Ottolenghi C, McElreavey K. (2000) Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol Genet Metab.* 71:397-404.

Ottolenghi C, 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.

Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EM, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG. (1987). The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-1104.

Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas NE, Fellous M.(1989) Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature*. 342:937-9.

Palmer SJ, Burgoyne PS. (1991) In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX---XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development*. 112:265-8.

Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kuhl M. (2002) Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature*. 418:636-41.

Park SY, Meeks JJ, Raverot G, Pfaff LE, Weiss J, Hammer GD, Jameson JL. (2005) Nuclear receptors Sfl and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development*. 132:2415-23.

Parker KL, Schimmer BP. (1997) Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*. 18:361-77.

Parker KL. (1998) The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol Cell Endocrinol*. 145:15-20.

Paro R, Hogness DS. (1991) The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:263-7.

Patek CE, Little MH, Fleming S, Miles C, Charlieu JP, Clarke AR, Miyagawa K, Christie S, Doig J, Harrison DJ, Porteous DJ, Brookes AJ, Hooper ML, Hastie ND.

(1999) A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2931-6.

Patient RK, McGhee JD. (2002) The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 416-422.

Payen E, Pailhoux E, Abou Merhi 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.* 40:567-75.

Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, et al. (1991a) Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67: 437-447.

Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE. (1991b) WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumor. *Nature* 353: 431-434.

Pieau C. (1996) Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* 18: 523-528.

Pilon N, Daneau I, Paradis V, Hamel F, Lussier JG, Viger RS, Silversides DW. (2003) Porcine SRY is a target for steroidogenic factor 1. *Biol. Reprod.* 68: 1098-1106.

Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. (1994) Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J.* 13: 6115-6124.

Poulat F, Barbara PS, 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: 7167-7172.

Preiss S, Argentaro A, Clayton A, John A, Jans DA, Ogata T, Barroso I, Schafer AJ, Harley VR. (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, Bishop CE. (2005) Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum Mol Genet.* 14:1221-9.

Racley RR, Flenniken AM, Kuriyan NP, Kessler PM, Stoler MH, Williams BR. (1993) Expression of the Wilm's tumor suppressor gene, Wt1, during mouse embryogenesis. *Cell Growth Different.* 4: 1023-1031.

Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkins J, Zarkower D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691-695.

Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. (1999a) Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.* 215: 208-220.

Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hisch B, Zarkower D. (1999b) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum. Mol. Genet.* 8: 989-996.

Reddy JC, Licht JD. (1996) The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochim. Biophys. Acta.* 1287: 1-28.

Rhind NR, Miller LM, Kopczynski JB, Meyer BJ. (1995) Xol-1 acts as an early switch in the *C.elegans* male/hermaphrodite decision. *Cell* 55: 71-82.

Robert NM, Tremblay JJ, Viger RS. (2002) Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 Differentially Repress the GATA-Dependent Activity of Multiple Gonadal Promoters. *Endocrinology* 143: 3963-3973.

Roberts LM, Hirokawa Y, Nachtigal MW, Ingraham HA. (1999) Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development. *Dev. Biol.* 208: 110-122.

Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dube MP, Zhang LH, Singaraja RR, Guernsey DL, Zheng B, Siebert LF, Hoskin-Mott A, Trese MT, Pimstone SN, Shastry BS, Moon RT, Hayden MR, Goldberg YP, Samuels ME. (2002) Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet.* 32:326-30.

Ross AJ, Tilman C, Yao H, MacLaughlin D, Capel B. (2003) AMH induces mesonephric cell migration in XX gonads. *Mol Cell Endocrinol.* 211:1-7.

Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. (2001) Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* 15:1998-2009.

Sarraj MA, Wilmore HP, McClive PJ, Sinclair AH. (2003) Sox15 is up regulated in the embryonic mouse testis. *Gene Expr Patterns.* 3:413-7.

Scazzocchio C. (2000) The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol.* 3:126-31.

Schepers GE, Bullejos M, Hosking BM, Koopman P. (2000) Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res.* 28:1473-80

Schepers G, Wilson M, Wilhelm D, Koopman P. (2003) SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergize with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* 278: 28101-28108.

Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* 127: 65-73.

Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, Ornitz DM, Capel B. (2004) Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development.* 131:3627-36.

Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development.* 131:933-42.

Schneider-Gadicke A, Beer-Romero P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC.(1989) ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*. 57:1247-58.

Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G, Lovell-Badge R. (2004) SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol*. 274:271-9.

Shao Y, Lu J, Zhang G, Liu C, Huang B. (2005) Histone acetyltransferase p300 promotes the activation of human WT1 promoter and intronic enhancer. *Arch Biochem Biophys*. 436:62-8.

Sharma PM, Bowman M, Madden S, Rauscher III FJ, Sukumar S. (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev*. 8: 720-731.

Shawlot W, Behringer RR. (1995) Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* 374: 425-430.

Shen JH-C, Ingraham HA. (2002) Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol. Endocrinol*. 16: 529-540.

Shen MM, Hodgkin J. (1998) Mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell* 54: 1019-1031.

Shen W-H, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. (1994) Nuclear receptor SF-1 regulates the MIS gene: a link to sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661.

Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J, Lau Yfc, Saunders GF. (1997) The Wilm's tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation :

SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin. Cancer Res.* 3: 2571-2580.

Shimogori T, Banuchi V, Ng HY, Strauss JB, Grove EA. (2004) Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development.* 131:5639-47.

Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Roberts CT Jr, Daniel CW. (1997) Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:8132-7.

Sim H, Rimmer K, Kelly S, Ludbrook LM, Clayton AH, Harley VR. (2005) Defective calmodulin-mediated nuclear transport of SRY in XY sex reversal. *Mol Endocrinol.* Mar 3; [Epub ahead of print]

Sinclair AH, Foster JW, Spencer JA, Page DC, Palmer M, Goodfellow PN, Graves JA. (1988) Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 336:780-3.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.

Small CL, Shima JE, Uzumcu M, Skinner MK, Griswold MD. (2005) Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. *Biol Reprod.* 72:492-501. Epub 2004 Oct 20.

Smith CA, McClive PJ, Western PS, Reed KJ, Sinclair AH. 1999. Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402:601-2.

Smith CA, Katz M, Sinclair AH. (2003a) DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol Reprod.* 68:560-70.

Smith L, Van Hateren N, Willan J, Romero R, Blanco G, Siggers P, Walsh J, Banerjee R, Denny P, Ponting C, Greenfield A. (2003b) Candidate testis-determining gene, Maestro (Mro), encodes a novel HEAT repeat protein. *Dev Dyn.* 227:600-7.

Sock E, Schmidt K, Hermanns-Borgmeyer I, Bosl MR, Wegner M. (2001) Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol Cell Biol.* 21:6951-9.

Soyal SM, Amleh A, Dean J. (2000) FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development.* 127:4645-54.

Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. (1994) Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature.* 372:679-83.

Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow PN. (1993) SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum. Mol. Genet.* 2: 2013-2018.

Su H, Lau YF. (1993) Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 24-38.

Sudbeck P, Schmitz ML, Baeuerle PA, Sherer G. (1996) Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat. Genet.* 13: 230-232.

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.* 23:238-49.

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) DAX-1 antagonizes SRY action in mammalian sex determination. *Nature* 391: 761-767.

Takayama K, Morohashi K, Honda S, Hara N, Omura T. (1994) Contribution of Ad4BP, a steroidogenic cell-specific transcription factor, to regulation of the human CYP11A and bovine CYP11B genes through their distal promoters. *J. Biochem. (Tokyo)* 116: 193-203.

Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Inoue K, Soma T, Oka Y, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Fuchigami K, Tomonaga M, Toyama K, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H. (1999) The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 13:393-9.

Tevosian SG, Deconinck AE, Cantor AB, Rieff HI, Fujiwara Y, Corfas G, Orkins SH. (1999) FOG-2 : A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 950-955.

Tevosian SG, Albreicht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM. (2002) Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129: 4627-4634.

Thevenet L, Mejean C, Moniot B, Bonneaud N, Galeotti N, Aldrian-Herrada G, Poulat F, Berta P, Benkirane M, Boizet-Bonhoure B. (2004) Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J.* 23:3336-45.

Tilmann C, Capel B. (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* 126: 2883-2890.

Tilmann C, Capel B. (2002) Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog. Horm. Res.* 57: 1-18.

Toyooka Y, Tanaka SS, Hirota O, Tanaka S, Takagi N, Yamanouchi K, Tojo H, Tachi C. (1998) Wilms' tumor suppressor gene (WT1) as a target gene of SRY function in a mouse ES cell line transfected with SRY. *Int J Dev Biol.* 42:1143-51.

Tremblay JJ, Viger RS. (1999) Transcription factor GATA4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol. Endocrinol.* 13: 1388-1401.

Tremblay JJ, Viger RS. (2001) Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol. Repro.* 64: 1191-1199.

Trimmer EE, Zamble DB, Lippard SJ, Essigmann JM. (1998) Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry* 37: 352-362.

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet.* 13:1171-81.

Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 125: 4225-4234.

Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, Hardling B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns J-P, Van de Ven W,

Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon A. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature* 397: 405-409.

Veitia RA, Nunes M, McElreavey K, Fellous M. (1997a) Genetic basis of human sex determination: an overview. *Theriogenology* 47: 83-91.

Veitia RA, Nunes M, Brauner R, Doco-Fenzy M, Joanny-Flinois O, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Fellous M, McElreavey K. (1997b) 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.

Veretnik S, Gribskov M. (1999) RNA binding domain of HDV antigen is homologue to the HMG box of SRY. *Arch. Virol.* 144: 1139-1158.

Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28: 216-7.

Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, 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, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. (1984) Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology.* 114:1315-20.

Vilain E, McElrealvey K, Jaubert F, Raymond JP, Richaud F, Fellous M. (1992) Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 1008-1011.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79: 111-1120.

Wakefield MJ, Graves JA. (2005) Marsupials and monotremes sort genome treasures from junk. *Genome Biol.* 6:218.

Wedeen C, Harding K, Levine M. (1986) Spatial regulation of Antennapedia and bithorax gene expression by the Polycomb locus in *Drosophila*. *Cell*. 44:739-48.

Weiss MJ, Orkin SH. (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol*. 23:99-107.

Weiss J, Meeks J, Hurley L, Jameson JL. (2003) Targeted deletion of Sox3 impairs gametogenesis in male and female mice. Third international symposium on the biology of vertebrate sex determination. Hawaii.

Wertz K, Herrmann BG. (2000) Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mech. Dev.* 98: 51-70.

Wilhelm D, Englert C. (2002) The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl. *Genes Dev.* 16: 1839-1851.

Willerton L, Smith RA, Russell D, Mackay S. (2004) Effects of FGF9 on embryonic Sertoli cell proliferation and testicular cord formation in the mouse. *Int J Dev Biol*. 48:637-43.

Wirth J, Wagner T, Meyer J, Pfeiffer RA, Tietze HU, Schempp W, Scherer G. (1996) Translocation breakpoints in three patients with campomelic dysplasia and autosomal sex reversal map more than 130 kb from SOX9. *Hum Genet.* 97:186-93.

Wunderle VM, Critcher R, Hastie N, Goodfellow PN, Schedl A. (1998) Deletion of long-range regulatory elements upstream of SOX9 causes campomelic dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10649-54.

Yang H, Lu M, Zhang L, Whitsett JA, Morrisey EE. (2002) GATA6 regulates differentiation of distal lung epithelium. *Development* 129: 2233-2246.

Yao HH, DiNapoli L, Capel B. (2003) Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development*. 130:5895-902.

Yao HH, Matzuk MM, Jorgez CJ, Menke DB, Page DC, Swain A, Capel B. (2004) Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn*. 230:210-5.

Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, Kuratani S, Aizawa S. (1997) Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon. *Development*. 124:101-11.

Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL. (1998a) Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat. Genet.* 20: 353-357.

Yu RN, Ito M, Jameson JL. (1998b) The murine DAX-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol. Endocrinol.* 12: 1010-1022.

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ERB, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G. (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 DM, Sassone-Corsi P. (1997) DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature*. 390:311-5.

Zhang P, Mellon SH. (1996) The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 regulates the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcriptional activation of rat cytochrome P450c17 (17 alpha-hydroxylase/c17-20 lyase). *Mol. Endocrinol.* 10: 147-158.

Zhao L, Bakke M, Krimkevich Y, Cushman LJ, Parlow AF, Camper SA, Parker KL. (2001) Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development*. 128:147-54.

Zimmermann S, Schwarzler A, Buth S, Engel W, Adham IM. (1998) Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1. *Mol. Endocrinol.* 12: 706-713.

Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, Engel W, Adham IM. (1999) Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol. Endocrinol.* 13: 681-691.

Zink B, Paro R. (1989) In vivo binding pattern of a trans-regulator of homoeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 337:468-71.

ANNEXE I

**Rapid genomic identification of transgenic integration sites for
mouse insertional mutants**

ALEXANDRE BOYER, MARILÈNE PAQUET, DIANA RAIWET,
ISABELLE DANEAU, WILBUR HARRISON, AND DAVID W.
SILVERSIDES

BIOTECHNIQUES 34: 32-36, 2003

Rapid genomic identification of transgenic integration sites for mouse insertional mutants

Alexandre Boyer¹, Marilène Paquet¹, Diana Raiwet¹, Isabelle Daneau¹, Wilbur Harrison²
and
David W. Silversides^{1*}

¹Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

²Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

* Author for correspondence at address 

TECHNICAL REPORT

The Universal GenomeWalker™ DNA cloning kit (Clontech) provides a commercially available PCR based technique designed to find unknown DNA sequences adjacent to known genomic sequences. Here we report specific adaptations of this technique to provide a powerful, versatile and rapid method for cloning transgene insertion sites. These modifications are designed to favor the amplification of bona fide integration sites over internal transgene fragments, and are not dependant on prior knowledge of potentially complex transgene rearrangements. When combined with now available mouse genome databases, this permits the rapid identification of genes inactivated via insertional mutagenesis.

Transgenic mouse lines harboring insertional mutations represent a valuable resource for correlating gene structure with gene function (5,7,12). Cloning the site of transgene insertion has traditionally been an arduous endeavor, involving the creation of a genomic library of mutant mouse DNA usually in lambda phage, and the screening of the library with a labeled probe corresponding to the transgene used. These methods are now supplemented by PCR based amplification techniques developed to generate flanking genomic DNA sequences (1,2,4,8,9,10,11,13,14). Once the integration site is identified, extensive genomic sequencing of normal mouse DNA is still required to identify regional exons and candidate genes to account for mutant phenotypes.

In the present studies, transgenic mice were generated via conventional pronuclear microinjection. Two transgenes were co-injected, including the transgene of interest for the biological studies undertaken and a tyrosinase minigene used as a visual pigmentation marker for transgenesis (6). A founder (F0) animal was identified by the presence of pigmentation and by PCR analysis for the transgene of interest; analysis of F1 animals revealed that the transgene of interest and the tyrosinase minigene co-segregated in an autosomal fashion, indicating a single transgene integration site incorporating both transgenes. When F2 homozygous animals were generated, a phenotype involving a mild neuromuscular deficit (trembling) was observed, indicated the possibility of an insertional

mutation. These trembling animals were confirmed homozygote recessive by backcross breeding trials. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using labeled transgenes was then performed on metaphase spreads of splenocytes taken from trembling animals. These studies confirmed that the animals were homozygote for transgene insertion, and identified the site of insertion as mouse chromosome 6 region C (data not shown).

It was decided to clone out the genomic site of transgene integration, adapting the Universal GenomeWalker™ DNA cloning kit (Clontech) for this purpose. DNA was extracted from spleen and kidneys of a mouse homozygous for the transgenes using standard methods. Enzymes for genomic DNA digestions were chosen such that they did not cut within the transgenes used to generate the transgenic mice. Genomic DNA (2.5 µg) was digested separately with *EcoRI*, *KpnI*, *MluI*, *NheI*, *SacII*, *Sall*, *SpeI* and *SphII*. Because the restriction enzymes chosen did not cut in a blunt fashion, an additional step to the provided protocol was performed, to blunt the genomic fragments before the adaptor ligation step. Genomic DNA digests were incubated with 1 µl of Klenow polymerase I (USB) and 1.5 µl of dNTPs 25mM for 1h at 37°C. Purification of the digested, blunted genomic DNA and ligation to the GenomeWalker adaptor was then performed according to the user manual.

The rationale for specific primer design is as follows. With two transgenes involved, four possible transgene orientations at the site of transgene integration are possible. Specific primers representing 3 of these possibilities were designed and synthesized, including sense primers from the 3' end of the tyrosinase minigene (TyrosinaseWalk.A 5'- AGCCACTCCTCATGGACAAAGACGACTA and TyrosinaseWalk.B 5' ACAGCTTGCTGTATCAGAGCCATCTGT). In addition, 3'-sense and 5'-antisense primers from the transgene of interest were also designed but are not presented. PCR and nested PCR were performed as described in Universal GenomeWalker™ kit user manual. The results obtained using primers TyrosinaseWalk.A and AP1 for the first PCR and TyrosinaseWalk.B and AP2 for the nested PCR are shown in Figure 1. Four out of eight restriction mini-libraries generated identifiable bands suitable for cloning. Bands for *EcoRI* nested PCR,

NheI primary PCR and *SacII* nested PCR were subcloned into the pGEM-T vector (Promega), whereas bands for the *SpeI* PCRs were judged relatively small compared to other bands and were not subcloned. In total 6 unique bands were sequenced, and the sequences blasted with the Ensembl mouse genome data. Sequences of two amplified bands, from the *NheI* and *SacII* restricted mini-libraries, co-localized to genomic sequences within Chr. 7E, representing the endogenous tyrosinase gene locus. Sequences of four amplified bands, two each from the *SacII* and *EcoRI* restricted mini-libraries, co-localized to genomic sequences located at Chr. 6C1, and represented one flank of the transgene integration site. Interestingly, the *SacII* restricted mini-library was able to identify both the endogenous tyrosinase genomic locus as well as the transgene insertion site. A more detailed analysis of the transgene integration site at Chr. 6C1 showed that the flanking sequences are located within intron 1 of the *Grid2* gene (Fig 2), thus providing an explanation for the trembling phenotype seen in the homozygote recessive animals (3). As a functional confirmation, RT-PCR studies on RNA extracted from the cerebellum of mice displaying the trembling phenotype failed to show evidence for *Grid2* gene expression, whereas similar analysis on non trembling (heterozygote) transgenic littermates and on non transgenic control mice generated an amplified band of the predicted size (data not shown).

Two important modifications to the original Universal GenomeWalker™ kit protocol were made to accommodate the particularities of transgenic integration sites generated from pronuclear microinjection. We were able to show that the choice of the enzyme is not be limited to those that cut in a blunt fashion, although DNA fragments with 5' or 3' overhangs must be subsequently rendered blunt. This allows freedom of choice of restriction enzymes and by avoiding enzymes that cut within the transgene. This in turn provides the decided advantage of a method that favors informative amplifications at the site of transgene integration, and disfavors non informative amplifications from within the transgenes themselves. The second modification is the design of specific primers, where because of our two transgene co-injection strategy, four pairs of specific primers were designed for the PCR and nested PCR amplifications. By performing the amplification, cloning and

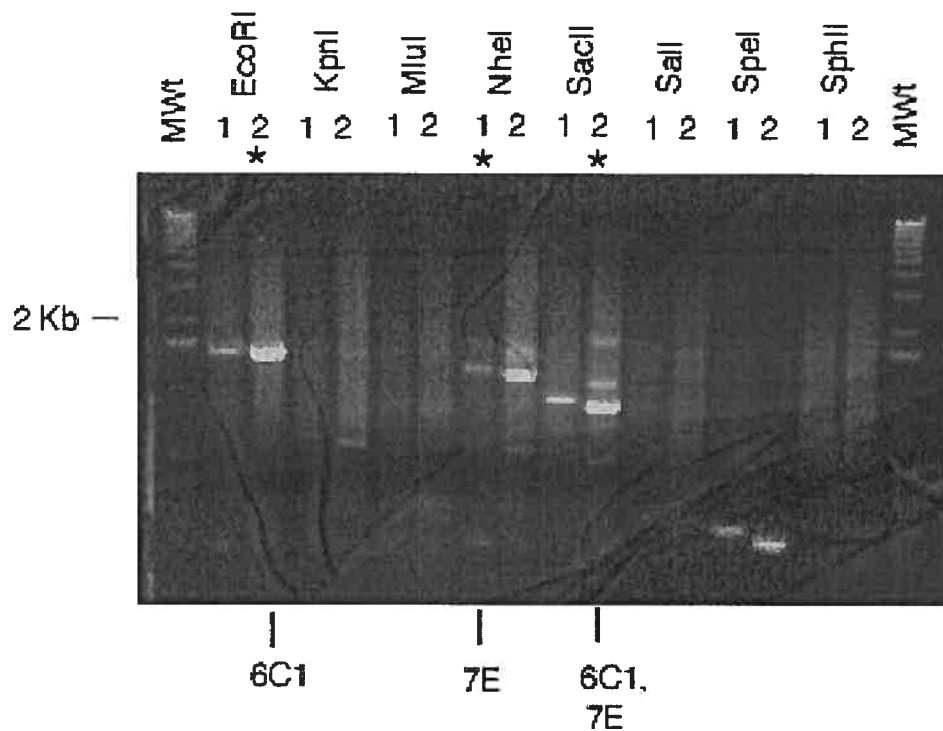


Figure 1: Amplification of restriction enzyme mini-genomic libraries. The amplifications involving the tyrosinase transgene 3' sense primers are presented, as they were to prove useful in determining the genomic site of integration for the transgenes. The restriction enzymes used to generate the mini-genomic libraries are as marked. The numbers 1 and 2 refer to the primary PCR and the nested PCR reactions, respectively. The productive amplifications are indicated by (*), and are further marked as generating tyrosine sequences (Chr. 7E), transgene integration site (Chr. 6C1), or both. MWt represents the molecular weight marker (1 kb ladder, Gibco-BRL).

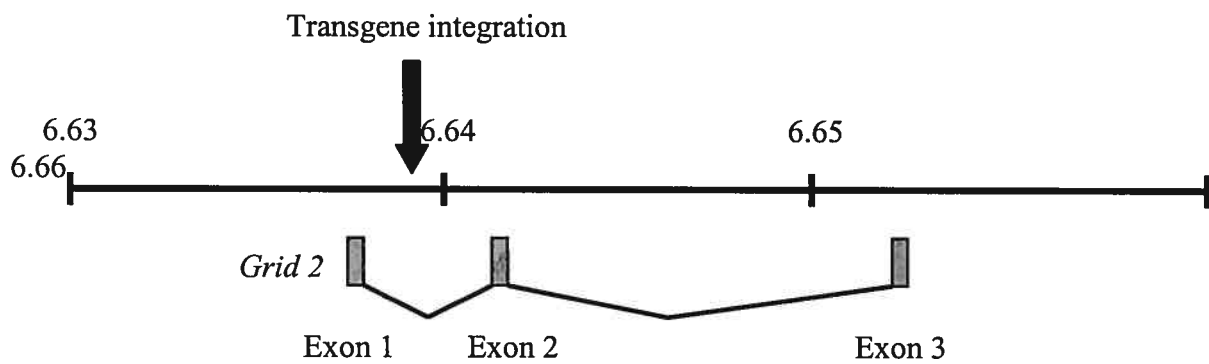


Figure 2 Gene map of the transgene integration site, within intron 1 of the mouse *Grid2* gene. The numbering, e.g. 6.64, represents a distance of 64 million base pairs from the centromere of mouse chromosome 6.

sequencing steps sequentially, we were able to identify the integration site after using three of these primer sets.

In conclusion, the Universal GenomeWalker™ Kit protocol is robust and easily adapted for deriving genomic flanking sequences at the site of transgene integration after pronuclear microinjection in mice. This in combination with now available mouse genome resources such as Ensemble provides a powerful and rapid system for identifying disrupted genes in the study of mouse transgene insertional mutagenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a fellowship to A. Boyer from the Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and research grants from the National Science and Engineering Research Council (NSERC) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR).

REFERENCES

Daneau, J., J.F. Ethier, J.G. Lussier, D.W. Silversides. (1996) Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biol Reprod.* 55:47-53.

Harrison, R.W., J.C. Miller, M.J. D'Souza, G. Kampo. (1997) Easy gene walking. *Biotechniques* 22:650-3.

Lalouette, A., J.L.Guenet, S. Vríz. (1998) Hotfoot mouse mutations affect the delta 2 glutamate receptor gene and are allelic to *lurcher*. *Genomics* 50:9-13.

Megonigal, M.D., E.F. Rappaport, R.B. Wilson, D.H. Jones, J.A. Whitlock, J.A. Ortega, D.J. Slater, P.C. Nowell, C.A. Felix. (2000) Panhandle PCR for cDNA: a rapid method for isolation of MLL fusion transcripts involving unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9597-602.

Meisler, M.H. (1992) Insertional mutation of classical and novel genes in transgenic mice. *Trends Genetics* 8:341-344.

Méthot, D., T.L. Reudelhuber, D.W. Silversides. (1995) Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 23:4551-6.

Mochizuki, T., Y. Saijoh, K. Tsuchiya, Y. Shirayoshi, S. Takai, C. Taya, H. Yonekawa, K. Yamada, H. Nihei, N. Nakatsuji, P.A. Overbeek, H. Hamada, T. Yokoyama. (1998) Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 395:177-81.

Myrick, K.V. and W.M. Gelbart. (2002) Universal fast walking for direct and versatile determination of flanking sequence. *Gene* 284:125-131.

Ochman, H., A.S. Gerber, D.L. Hartl. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621-623.

Schmidt, M., G. Hoffmann, M. Wissler, N. Lemke, A. Mussig, H. Glimm, D.A. Williams, S. Ragg, C.U. Hesemann, C. von Kalle. (2001) Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther.* 12:743-9.

Screaton, G.R., C.R. Bangham, J.I. Bell. (1993) Direct sequencing of single primer PCR products: a rapid method to achieve short chromosomal walks. *Nucleic Acids Res.* 21:2263-4.

Shawlot, W., M.J. Siciliano, R.L. Stallings, P.A. Overbeek. (1989) Insertional inactivation of the downless gene in a family of transgenic mice. *Mol Biol Med.* 6:299-307.

Siebert, P.D., A. Chenchik, D.E. Kellogg, K.A. Lukyanov, S.A. Lukyanov. (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23:1087-8.

Triglia, T., M.G. Peterson, D.J. Kemp. (1988) A procedure for an in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16:8186.

ANNEXE II : PROTOCOLE DE CULTURE DE TRANCHES DE TISSUS

1. Croiser les lignées de souris transgéniques de votre choix.
2. Récupérer les embryons de souris au jour e11.5 et compter le nombre de somites caudales (ts).
3. Conserver les embryons ayant entre 15 et 19 ts.
4. Couper la tête et la queue d'un embryon, conserver ce tissu pour récupérer l'ADN génomique et sexer par PCR.
5. Continuer la dissection avec le torse.
6. Éviscérer un embryon afin de bien voir la crête urogénitale.
7. Placer l'embryon dans un bloc d'agar 3%/ H₂O.
8. Couper l'embryon en tranches de 300µm avec un vibrotome (Leica VT 1000S).
9. Placer la tranche sur un filtre dans un pétri de culture (Costar 3428, 24mm, pores 8.0µm) contenant 2ml de milieu DMEM.
10. Incuber.

Variante 1

1. Suite à l'étape 8, disséquer la crête urogénitale d'un côté de l'embryon.
2. Mettre sur filtre.
3. Transplanter la crête urogénitale d'une autre lignée transgénique.
4. Continuer avec l'étape 9.

Variante 2

1. Suite à l'étape 8, placer la tranche sur un filtre dans un pétri de culture (Bioprotechs, Delta T dishes 0.17mm) contenant 800µl de milieu DMEM.
2. À différents moments de l'incubation remplacer le milieu DMEM par le milieu M2 et regarder l'évolution de la tranche au microscope confocal en plaçant le pétri de culture dans une chambre de culture (Bioprotechs T4UUSA 5962-10-04).
3. Remplacer le milieu M2 par le milieu DMEM et incuber.