



HAL
open science

Étude des gènes R-spondin1 et Sox9, impliqués dans les inversions de sexe et l'homéostasie de l'ovaire adulte chez la souris

Eva Pauper

► **To cite this version:**

Eva Pauper. Étude des gènes R-spondin1 et Sox9, impliqués dans les inversions de sexe et l'homéostasie de l'ovaire adulte chez la souris. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4054 . tel-01127480

HAL Id: tel-01127480

<https://theses.hal.science/tel-01127480>

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS
Année 2014

**ETUDE DES GENES R-SPONDIN1 ET SOX9, IMPLIQUES DANS
LES INVERSIONS DE SEXE
ET L'HOMÉOSTASIE DE L'OVAIRE ADULTE
CHEZ LA SOURIS**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

Spécialité Interactions Moléculaires et Cellulaires

Soutenue par

Eva PAUPER

Le 5 Septembre 2014

Directrice de thèse: Docteur Marie-Christine CHABOISSIER

JURY

Docteur Eric PAILHOUX

Docteur Nathalie DI CLEMENTE

Docteur Nadine BINART

Docteur Isabelle GILLOT

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Plus particulièrement, le Docteur Di Clemente Nathalie et le Docteur Binart Nadine, rapporteurs de ma thèse.

Je remercie également beaucoup le Docteur Eric Pailhoux d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, ainsi que d'avoir financé ma 3^{ème} année de thèse.

Cette thèse a été effectuée sous la direction du Docteur Marie-Christine Chaboissier que je tiens tout particulièrement à remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée dès mon arrivée au laboratoire. Je te remercie également beaucoup pour ta patience et ta façon si positive de voir les choses, qui n'est pas donnée à tout le monde ! Merci également de m'avoir transmis une petite partie de ton savoir, j'ai encore beaucoup à apprendre évidemment !

Un grand merci également à Isabelle Gillot (aka Isa pour les habitués) pour avoir accepté de m'encadrer surtout pendant les moments difficiles de cette dernière année de thèse. Que dire de mon expérience à tes côtés sinon que j'admire beaucoup ta polyvalence, ton esprit critique et ton honnêteté, sur tous les plans, scientifiques et autres ! Merci pour ces discussions scientifiques et humaines ainsi que ces petites intentions à tous moments que je n'oublierais pas...(Nicolas non plus d'ailleurs !)

Je voudrais aussi remercier tout particulièrement les membres de mon équipe passés et présents : Régine, même si cela fut court tu étais là à mon arrivée à Nice et au laboratoire, je te remercie pour ton énergie ultra positive !! Christelle, l'étudiante en M1 que j'ai encadré au cours de ma 3^{ème} année, merci de m'avoir aidé à avancer dans mon projet, ton encadrement fut une expérience que j'ai beaucoup apprécié ! Rowena, Yann, Maxime, Clara, tous présents pendant des périodes plus ou moins longues. Un grand merci à Amandine aussi pour ses conseils et son expérience scientifique que j'admire. Enfin, un très gros merci à Elooooooo ☺ Merci pour tout ton temps passé dès mon arrivée à me rendre fonctionnelle au laboratoire, puisque je n'avais aucune expérience chez la souris. Et puis tellement d'autres choses à côté de cela bien sûr...Merci d'avoir été mon amie et ma « famille » pendant mes moments de solitude Niçoise, j'espère que cela durera encore bien longtemps ! Merci à ta petite famille aussi, Bruno, Cléa et Elena !

Merci aussi aux membres du Schedl's lab passés et présents pour ces bons moments passés à vos côtés ainsi que tous les conseils scientifiques ! Roberto, Glenda, Agnès, Fariba, Jonathan, Valérie, Sonia, Haroun, Clara (la même que tout à l'heure!), Aurelie, Fabio, Filippo. Un merci tout particulier aux « cat-mamas » Yasmine et Ana ☺. Je remercie aussi bien sûr tous les membres des équipes de notre unité !

Je tiens maintenant à remercier des personnes très importantes pour moi. Tout d'abord ma famille, merci de m'avoir soutenue tout au long de mes études et d'avoir cru en moi, même quand moi je n'y croyais plus trop...Une grosse pensée pour vous, μαμά, μπαμπά, μαρκούλη, mamie ☺

Merci aussi à Gaby et à mes beaux-parents !

Merci également à tous mes amis aux quatre coins du monde que je ne pourrais pas citer car nombreux. Vous êtes tous dans mon cœur !

Enfin, le plus gros merci à ma petite famille à moi (Fillipo, Nicolas, Iris et Darko)...Filippo, que dire, je dois te remercier pour tellement de choses :D Merci d'avoir été là depuis le début, de m'avoir supportée (:P pas toujours évident !), soutenue, conseillée, aidée (que ce soit au niveau scientifique ou non ☺). Je suis très heureuse d'avoir partagé ces années fortes en émotions à tes côtés ! Je compte d'ailleurs en partager beaucoup d'autres encore ... Merci aussi pour le plus beau cadeau que l'on ait pu m'offrir, le petit Nicolas. Merci à toi mon petit Nicolas, tu n'es pas là depuis très longtemps mais tu m'apprends et m'apporte tellement de choses...Un gros bisous de maman !

Merci encore à tous !

Liste des abréviations

AMH:	anti müllerian hormone
APC:	adenomatous polyposis coli
<i>BCL-2:</i>	<i>B-cell lymphoma</i>
BMP:	bone morphogenetic protein
BPES:	blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome
BRCA 1/2 :	breast cancer 1/2
CK1α:	Caséine kinase I α
Dmrt1:	doublesex and mab-3 related transcription factor 1
<i>EGFP:</i>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF2B :	Eukaryotic translation initiation factor 2B
ESO:	epithelium de surface ovarien
<i>Fgf9:</i>	<i>Fibroblast growth factor 9</i>
<i>Fgfr2:</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>
FIGLa :	Factor In the GermLine α
<i>Foxl2:</i>	<i>forkhead box L2</i>
FSH:	follicle stimulating hormone
FST :	follistatine
Fzd:	Frizzled
<i>Gata4:</i>	<i>GATA binding protein 4</i>
GSK3:	Glycogen Synthase Kinase 3
<i>HMG:</i>	<i>high mobility group</i>
IGF1:	Insulin-like growth factor
JNK:	kinase JUN-N-terminal
<i>Jpc:</i>	<i>jours post coitum</i>
<i>Jpp:</i>	<i>jours post partum</i>
LEF:	Lymphoid enhancing factor
<i>LGR:</i>	<i>G protein-coupled receptor</i>
LH:	luteinizing hormone
LRP:	Low density lipoprotein receptor related protein
NOBOX :	Newborn oogenesis homeobox
PCP:	polarité cellulaire planaire

PGD2:	Prostaglandin D2
PKC:	<i>protein kinase C</i>
PLC:	<i>phospholipase C</i>
PPK:	<i>hyperkératose palmoplantaire</i>
Ptgds:	prostaglandin D synthase
PTK7:	<i>protein tyrosine kinase 7</i>
PTM:	péritubulaires myeloïdes
RAC1:	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RHOA:	Ras homolog gene family member A
ROR:	RAR-related orphan <i>receptor</i>
R-spondin1:	Roof plate-specific Spondin 1
SCC:	<i>carcinomes des cellules squameuses</i>
SFC:	stem cell factor
SF1:	Steroidogenic factor 1
Sox:	Sry-Related HMG box
SRY:	Sex-determining Region of the Y chromosome
TCF :	T-cell factor
TESCO:	testis-specific enhancer of Sox9 core element
TGFβ:	transforming growth factor beta
TSR-1:	thrombospondin type 1 repeat
VEGF:	vascular endothelial growth factor
Wnt:	Wingless-type MMTV integration site family member
WT1:	wilms tumor 1

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I – La détermination du sexe et la formation des gonades chez la souris.....	1
1. Formation de la gonade bipotentielle.....	1
2. Formation du testicule.....	3
3. Formation de l’ovaire.....	6
Chapitre II – <i>R-spondin1</i> et la voie Wnt/βcatenin.....	10
1. La voie de signalisation Wnt.....	12
1.1 Voie canonique- β catenin dépendante.....	12
1.2 Voies indépendante de β catenin- voies non-canoniques.....	13
2. Rôle des membres de la famille des R-spondins.....	14
3. Récepteurs des R-spondins.....	17
4. Mode d’action.....	18
Chapitre III – Gène <i>Sox9</i>, fonction et genes cibles.....	20
1. La famille des <i>Sox</i>	20
2. Expression de <i>Sox9</i>	20
3. Gènes cibles de <i>Sox9</i>	21
4. Fonction de <i>Sox9</i> dans l’ovaire.....	23
Chapitre IV – L’ovaire adulte.....	24
1. Folliculogenèse.....	24
2. Maturation folliculaire.....	25
2.1 Formation des follicules primordiaux.....	25
2.2 Recrutement des follicules primordiaux.....	26
2.3 Folliculogenèse pré-antrale.....	28
2.4 Formation de la thèque.....	28
2.5 Formation des follicules antraux.....	29
2.6 Le follicule pré-ovulatoire, l’expansion du cumulus, ovulation et lutéinisation.....	30
2.7 Le corps jaune (<i>corpus luteum</i>).....	30

3.	L'épithélium de surface ovarien.....	31
4.	Cancers ovariens.....	32
	4.1 Tumeurs épithéliales.....	32
	4.2 Tumeurs du stroma et des cellules de la granulosa.....	34
	4.3 Tumeurs des cellules germinales.....	34
5.	La voie WNT dans l'ovaire adulte.....	35

OBJECTIFS DE LA THESE.....	37
-----------------------------------	-----------

RESULTATS.....	39
-----------------------	-----------

A – Sox9/R-spondin1 et l'inversion de sexe.....	39
--	-----------

1. Article 1- Les souris XY invalidées pour le gène Sox9 au stade embryonnaire présentent une inversion de sexe complète et donnent des femelles partiellement fertiles.....	39
---	-----------

2. Article 2- L'inversion de sexe des souris XX Rspo1 peut avoir lieu en l'absence des determinants testiculaires Sry et Sox9.....	52
---	-----------

B – Développement normal et pathologique de l'ovaire.....	65
--	-----------

1.	Patron d'expression de <i>R-spondin1</i> et de la voie Wnt/ β catenin.....	65
2.	Rôle de <i>R-spondin1</i> dans le développement et le maintien de l'ovaire.....	66
3.	Caractérisation des tumeurs ovariennes dues à l'expression de <i>R-spondin1</i> ...70	
3.1	Modèle d'expression ectopique de <i>R-spondin1</i>	70
3.2	Apparition du phénotype.....	71
3.3	Caractérisation des structures folliculaires anormales.....	73
3.4	Apparition de kystes remplis de sang.....	77
3.5	Apparitions de cancers ovariens chez les individus de plus d'un an.....	78

MATERIEL ET METHODES.....	79
----------------------------------	-----------

DISCUSSION.....	82
------------------------	-----------

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....91

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....96

-INTRODUCTION-

Chapitre I : La détermination du sexe et la formation des gonades chez la souris

Le but essentiel de la détermination sexuelle est d'équiper les organismes avec l'anatomie et la physiologie nécessaires pour permettre la reproduction sexuée. Bien que chez les mammifères le devenir sexuel de l'organisme soit déterminé à la fécondation, ce devenir est révélé pendant le développement foetal. C'est à ce moment-là que la gonade commence à se différencier pour former un ovaire ou un testicule, après une période de bipotentialité sexuelle.

Plus précisément, chez les mammifères le sexe est déterminé par la présence ou l'absence du chromosome Y, apporté par le spermatozoïde. Le gène *SRY* (Sex-determining Region of the Y chromosome), porté par le chromosome Y, code pour le facteur essentiel à la détermination testiculaire (Sinclair et al., 1990). Chez les individus XX, en absence du chromosome Y, la gonade se différencie en ovaire. C'est pour cela que la voie femelle a été très longtemps considérée comme une voie par défaut, puisque le déterminant génétique responsable de la différenciation ovarienne est longtemps resté inconnu.

1. Formation de la gonade bipotentielle

Chez les mammifères, la gonade se forme à la surface du mésonephros dans la crête urogénitale. Grâce à la prolifération de l'épithélium coelomique, qui est un mésothélium particulier au niveau de la gonade. Plusieurs gènes sont impliqués dans la régulation de cette prolifération. Les gonades de souris XX et XY invalidées pour les gènes *Wnt4* et *Rspo1* présentent une diminution de la prolifération de l'épithélium coelomique et développent des gonades hypoplasiques (Chassot et al., 2012). *RSP01* et *WNT4* sont donc des régulateurs importants de cette étape de la différenciation gonadique. La voie de signalisation de l'insuline et les récepteurs *IGF1* sont également indispensables à cette étape (Pitetti et al., 2013), ainsi que la voie de signalisation impliquant *Sf1*, régulée par les facteurs de transcription *Six1* et *Six4* (Fujimoto et al., 2013). Une partie de ces cellules migrent de l'épithélium coelomique dans la gonade pour donner les cellules nourricières ou de support de la

gametogénèse. Les cellules germinales terminent leur migration qui a commencé dans l'allantoïde où elles se sont différenciées, en passant par le tube digestif et le mésonephros, pour entrer finalement dans la gonade. Jusqu'à ce stade, c'est à dire environ 12,5 *jpc* chez la souris, les gonades XX et XY ne se distinguent pas morphologiquement (Swain & Lovell-Badge, 1999). Parmi les cellules somatiques, les cellules « nourricières » des gonades XX et XY sont les premières à se différencier sexuellement : soit en cellules de la granulosa qui composeront plus tard les follicules de l'ovaire, soit en cellules de Sertoli qui participeront à la formation des cordons testiculaires du testicule. Le destin des autres types cellulaires de la gonade dépend des progéniteurs des cellules nourricières. Les cellules stéroïdogènes qui produisent les hormones mâles ou femelles se différencient après la spécification des cellules nourricières. Il n'était pas clair au départ si des précurseurs des cellules stéroïdogènes existent dans la gonade bipotentielle ou si ce linéage se différencie à partir de précurseurs somatiques multipotents, en réponse à des signaux provenant des cellules de support ou des cellules endothéliales (Habert, Lejeune, & Saez, 2001). Il a cependant été décrit récemment que les cellules stéroïdogènes du testicule embryonnaire jouent un rôle très important dans la formation des cordons séminifères et qu'il y a au moins 2 populations progénitrices distinctes qui donnent naissance aux cellules interstitielles de la gonade : l'épithélium cœlomique et des cellules spécialisées se trouvant à la frontière gonade-mésonephros (DeFalco, Takahashi, & Capel, 2011).

Les cellules germinales se spécifient sexuellement entre 12,5-13,5 *jpc* puisque c'est à ce moment là qu'elles entrent en méiose dans la gonade XX et qu'elles arrêtent de proliférer dans la gonade XY (Kocer, Reichmann, Best, & Adams, 2009). Il a longtemps été considéré que l'entrée en méiose dans les gonades XX dépend seulement de l'activité de l'acide rétinoïque. Le testicule préviendrait cette activité grâce à l'expression de *Cyp26B1* qui est une enzyme qui dégrade l'acide rétinoïque (Bowles et al., 2006). Il a été cependant montré récemment que l'acide rétinoïque n'est pas le seul acteur impliqué dans l'entrée en méiose des cellules germinales XX (S. Kumar et al., 2011). La voie de signalisation *WNT/βcatenin* semble être également activée dans les cellules germinales pour que celles-ci entrent en méiose. En l'absence de *RSP01*, un activateur majeur de cette voie dans l'ovaire (voir ci-dessous), les cellules germinales XX n'entrent pas en méiose et elles se différencient en cellules

germinales mâles, avant même la mise en place des cellules de Sertoli (Chassot et al., 2011).

La gonade bipotentielle est composée de cellules somatiques qui expriment principalement des gènes qui resteront exprimés dans l'ovaire tandis que les cellules germinales expriment des gènes de cellules germinales contribuant à la spermatogenèse (Jameson et al., 2012). Ainsi le linéage somatique doit être masculinisé pour permettre le développement testiculaire de la gonade XY.

2. Formation du testicule

La gonade XY se transforme en testicule bien structuré par le biais de 3 étapes majeures : 1) Engagement et expansion des cellules de Sertoli ; 2) compartimentation et organisation des cordons testiculaires, et 3) élongation des cordons testiculaires en tubes séminifères (Figure 1).

1) Les cellules de Sertoli coordonnent presque tous les aspects de la morphogenèse testiculaire, c'est pour cela que leur spécification est essentielle pour la formation du testicule (Svingen & Koopman, 2013). Elles proviennent des cellules progénitrices qui dérivent de l'épithélium cœlomique, une monocouche cellulaire qui recouvre entièrement la cavité cœlomique (Schmahl et al., 2000). Entre 11.5 et 12.5 *jpc* les cellules de l'épithélium cœlomique migrent à l'intérieur de la gonade XY et donnent naissance aux cellules de Sertoli mais aussi aux cellules interstitielles du testicule.

La différenciation des cellules de Sertoli est contrôlée par un seul facteur, SOX9, en aval du gène *SRY*, qui se situe sur le chromosome Y. Chez la souris, *Sry* est exprimé seulement entre 10.5 à 12.5 *jpc* dans les cellules progénitrices des cellules de Sertoli. Cette brève fenêtre d'expression signifie que *Sry* est important pour l'initiation de la différenciation des cellules de Sertoli, mais n'est pas indispensable à leur maintien (Koopman et al., 1990). La première cible connue de SRY est le facteur de transcription *Sox9* (SRY box 9), qui est activé dans les cellules précurseurs des cellules de Sertoli (Ryohei Sekido & Lovell-Badge, 2008). Plus précisément, *Sox9* est activé quand un complexe protéique composé de SRY et de SF1, se lie à un élément amplificateur connu sous le nom de « testis-specific enhancer of *Sox9* core élément »

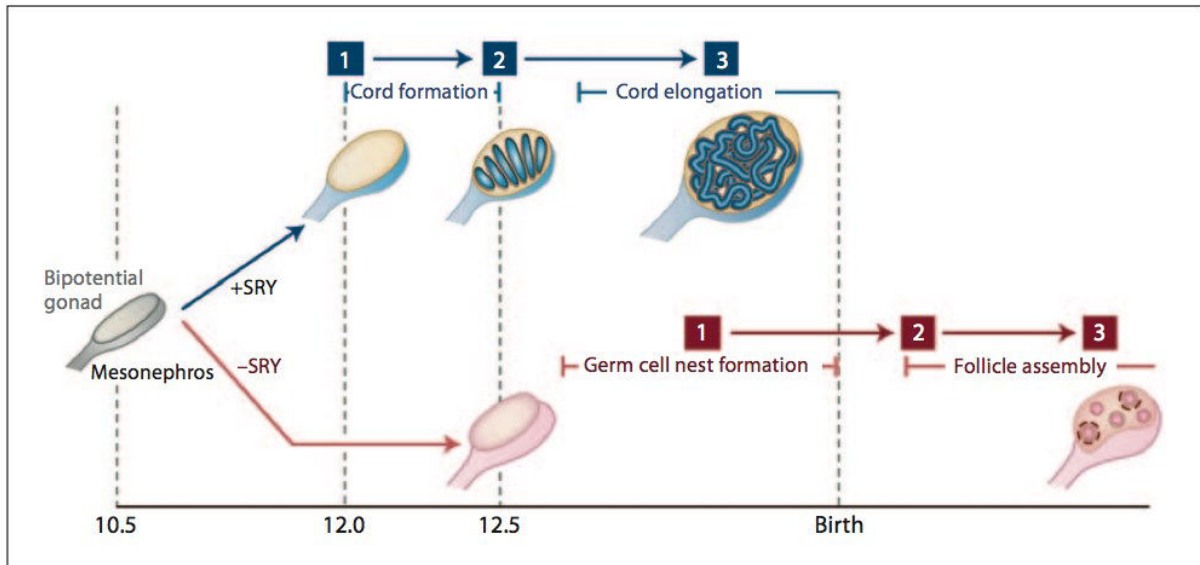


Figure 1: Les événements majeurs de la morphogenèse du testicule et de l'ovaire chez la souris. La gonade bipotentielle est formée à 10.5 *jpc*. Dans la gonade XY (En haut, bleu), *Sry* est exprimé à ce stade là et son expression conduit aux premières étapes de la morphogenèse du testicule, la spécification des cellules de Sertoli (1). A 12.5 *jpc* le testicule est déjà compartimentalisé. Cette étape se fait grâce à la migration de cellules endothéliales dans la gonade (2). L'étape finale du développement testiculaire est l'élongation des cordons testiculaires (3). Dans la gonade XX (En bas, rose), la spécification des cellules de la granulosa définit la première étape de la morphogenèse ovarienne (1). Les cellules germinales femelles entrent en méiose à 13.5 *jpc* et s'arrêtent au stade diplotène de la méiose I à 17.5 *jpc*. La spécification des cellules de la granulosa a lieu durant l'embryogenèse pour s'arrêter après la naissance (2) puis elles entourent les ovocytes pour former les follicules primordiaux. Pendant la première semaine de vie (3) les follicules continuent de se former et les cellules de la thèque sont recrutées afin de former les follicules primaires (Ungewitter & Yao, 2013).

(TESCO). Tout comme SRY, SOX9 est indispensable à la différenciation testiculaire puisque les souris mutantes pour le gène *Sox9* présentent une inversion de sexe complète. (Chaboissier et al., 2004). De plus l'expression ectopique de *Sox9* dans des gonades XX permet l'induction du développement male ce qui suggère que le rôle principal de SRY est d'induire l'expression de *Sox9* (Vidal et al., 2001).

A son tour, SOX9 induit l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules de Sertoli, tels que *Fgf9* (Fibroblast growth factor 9) et *Ptgds* (Prostaglandin D synthase). Contrairement à *Sry*, *Sox9* est exprimé tout au long de la vie foetale et persiste à l'âge adulte (Kent et al., 1996). Cependant son expression n'est pas indispensable pour le développement et le maintien du testicule après la détermination du sexe (Barrionuevo et al., 2009). *Sox9* reste nécessaire au maintien de la fertilité chez les mâles âgés de plus de 5 mois. Après la détermination du sexe, d'autres gènes *Sox* comme *Sox8* sont impliqués dans le développement testiculaire (Barrionuevo et al., 2009). De nombreux autres gènes sont nécessaires au développement testiculaire et la plupart conduisent au développement de gonades dysgéniques quand ils sont mutés. Parmi ces modèles, les souris invalidées pour le gène *Dmrt1* par exemple développent des testicules sévèrement dysmorphiques (Matson et al., 2011), et les souris invalidées pour le gène *Gata4*, présentent une mutation qui empêche l'interaction de GATA4 avec FOG-2. Ces modèles montrent que ces deux facteurs sont nécessaires à l'activation de *Sry*, puisque ces souris développent des testicules anormaux (Tevosian et al., 2002). *Sf1* est nécessaire au maintien de l'expression de *Sox9* et les souris invalidées pour ce gène ne développent pas de glandes surrénales et de gonades. Le gène *Wt1* est également très important pour le développement testiculaire puisqu'une dysgénésie gonadique sévère est observée chez les souris dépourvues de *Wt1*. Ces gènes font partie des plus importants impliqués dans le développement du testicule, mais il y en a plusieurs autres également qui ne sont pas cités ici (Ono & Harley, 2013).

Les mécanismes moléculaires qui régissent la première vague de prolifération des précurseurs des cellules de Sertoli sont résumés dans la figure 2 (Ungewitter & Yao, 2013)

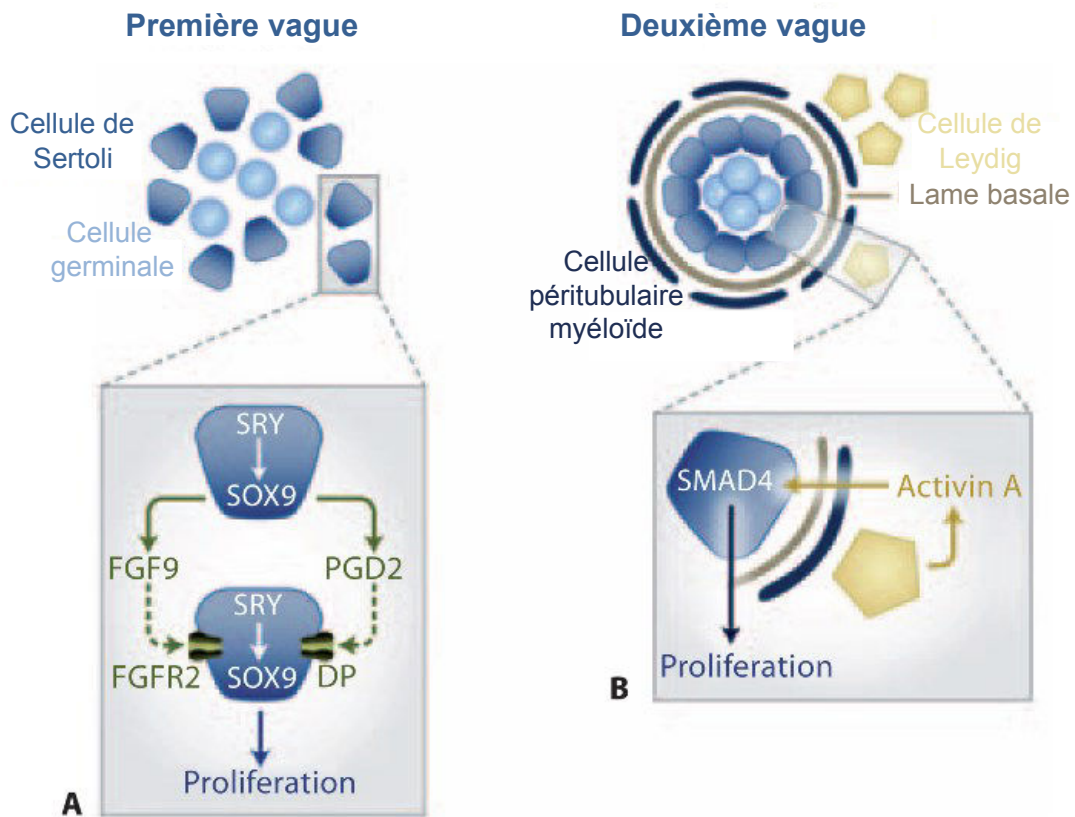


Figure 2: Spécification des cellules de Sertoli.

A. La première vague de prolifération des cellules de Sertoli a lieu en réponse à une boucle d'autorégulation initiée par SRY. SRY induit l'expression de *Sox9*, qui induit à son tour FGF9 et PGD2. Ces 2 facteurs activent leurs récepteurs sur les cellules pré-Sertoli avoisinantes, ce qui crée une boucle de régulation qui maintient l'expression de SOX9 et stimule la prolifération des cellules de Sertoli. **B.** La seconde vague a lieu après 15.5 *jpc* chez la souris et elle est induite par l'activine A produite par les cellules de Leydig, qui induit la prolifération des cellules de Sertoli via SMAD4. (Ungewitter & Yao, 2013)

2) Après la différenciation des cellules de Sertoli, la gonade XY commence à s'organiser en 2 parties indispensables aux fonctions testiculaires : les cordons testiculaires qui permettent la maturation des gamètes et le tissu interstitiel qui produit principalement les hormones.

La première vague de migration à partir de l'épithélium cœlomique a lieu à 11,2 *jpc* et donnera naissance à des cellules de Sertoli, des cellules interstitielles, ainsi que d'autres lignées cellulaires de la gonade (Karl & Capel, 1998). Le destin de ces cellules se restreint avec le temps. De 11.5-16.5 *jpc* une seconde population de cellules provenant du mésonephros cette fois-ci, migre à l'intérieur de la gonade XY. Cette migration est absolument indispensable à la formation des cordons testiculaires et les cellules qui en font partie sont incapables de se différencier en cellules de Sertoli, contrairement à la première vague décrite plus haut. Cette 2^{ème} vague de migration est constituée de cellules endothéliales (Combes et al., 2009) qui contribuent à la formation du réseau vasculaire du testicule. La formation des vaisseaux sanguins est contrôlée par *Sry* et commence à 12 *jpc* : VEGF et l'activine B promeuvent alors la vascularisation du testicule (Figure 3).

La dernière étape de la compartimentation du testicule est la formation de la membrane basale à fin de former une barrière physique autour des cordons testiculaires. Les données récoltées ces dernières années proposent le modèle suivant pour cette dernière étape: la migration des cellules endothéliales à l'intérieur du testicule définit la localisation des cordons. Des forces externes réorganisent par la suite ces structures primitives pour former les cordons. Finalement, les cellules de Sertoli avec les cellules péri tubulaires myéloïdes (PTM) synthétisent les constituants de la lame basale autour des cordons et créent un environnement dans lequel aura lieu la spermatogenèse. (Ungewitter & Yao, 2013).

3) Plus tardivement dans le développement fœtal les cordons testiculaires suivent un processus d'élongation pour former les tubes séminifères. Il a été démontré récemment que les cellules de Leydig fœtales contrôlent cette élongation. L'inactivation de l'activine A, membre de la famille du TGF β , dans les cellules de Leydig n'affecte pas la formation des cordons testiculaires mais affecte en revanche l'élongation de ces derniers après 15.5 *jpc* (Archambeault & Yao, 2010).

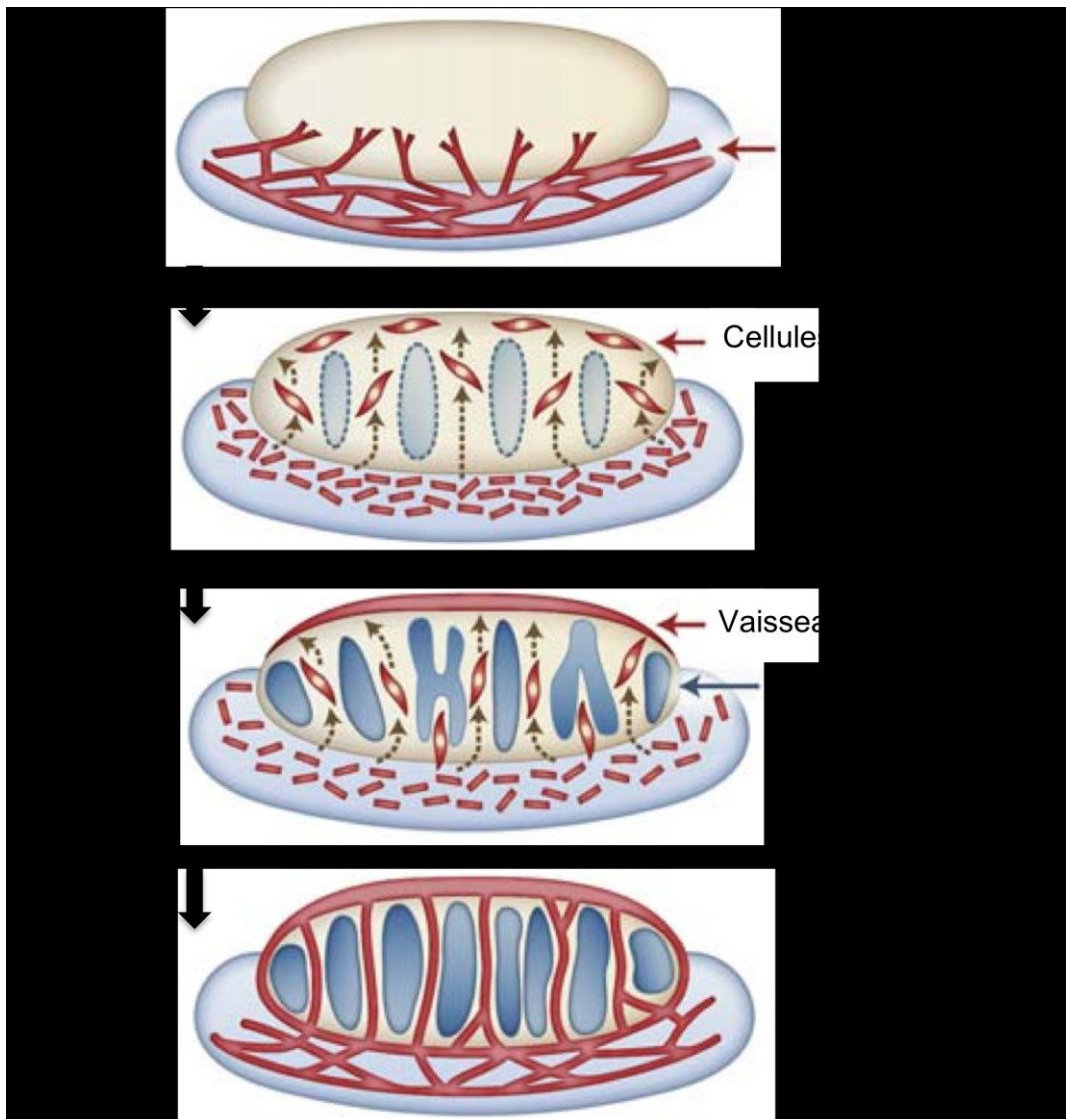


Figure 3: Migration des cellules endothéliales et formation des cordons testiculaires. Il y a très peu de vascularisation dans le testicule à 11.5 *jpc* mais une structure vasculaire est présente dans le mésonephros. Douze heures plus tard ce plexus vasculaire se rompt et des cellules endothéliales individuelles migrent dans le testicule, vers la région coelomique. A 12.5 *jpc*, le vaisseau coelomique est clairement visible et les cordons testiculaires se sont formés en suivant la migration des cellules endothéliales à l'intérieur du testicule (Ungewitter & Yao, 2013).

3. Formation de l'ovaire

La différenciation ovarienne a longtemps été considérée comme étant la différenciation gonadique par défaut en l'absence de *SRY*. Il a cependant été démontré depuis, qu'il existe plusieurs facteurs spécifiques de l'ovaire sans lesquels le développement ovarien ne peut pas avoir lieu. Trois événements cellulaires sont nécessaires à la formation de l'ovaire : 1) La spécification des cellules de la granulosa, 2) la formation des follicules (folliculogénèse) et, 3) la compartimentation des cellules somatiques (figure 1).

1) Chez la femelle, les cellules de la granulosa sont l'équivalent des cellules de Sertoli. Elles entourent les cellules germinales et secrètent des facteurs indispensables à la maturation des oocytes. Les cellules de la granulosa et les cellules de Sertoli auraient une origine commune puisque les fonctions de ces 2 types cellulaires sont similaires. Elles proviendraient de l'épithélium de surface de la gonade. Zheng et al., (2014) et Mork et al., (2012) ont démontré que beaucoup de cellules provenant de l'épithélium cœlomique, dénommé épithélium de surface ovarien à ce moment du développement (ESO), migrent à l'intérieur de l'ovaire et donnent naissance à des cellules de la granulosa, FOXL2 positives. Cette étude a été complétée récemment par une deuxième étude qui a suivi le devenir des cellules FOXL2-positives afin de déterminer avec plus de précision l'origine des follicules formés jusqu'à P7. Les principaux gènes connus nécessaires à la spécification des cellules de la granulosa sont *Rspo1*, *Wnt4* et *Foxl2*, chronologiquement.

RSPO1 joue un rôle essentiel dans la différenciation de l'ovaire. Ce gène a été décrit pour la première fois lors de l'étude d'une famille dans laquelle 4 frères présentaient une inversion sexuelle de type mâle XX (Parma et al., 2006). Chez la souris, *R-spondin1* est exprimé dans la gonade indifférenciée à 11,5 *jpc*, puis à partir de 12.5 *jpc* son expression est restreinte à l'épithélium cœlomique chez le mâle. Son ablation induit une inversion de sexe partielle chez les souris XX qui présentent un hermaphroditisme au niveau des organes génitaux externes (Chassot et al., 2008). La même étude a démontré qu'en absence de *R-spondin1*, la voie WNT/ β -catenin n'est plus active dans les gonades des individus XX. Ceci suggère que RSPO1 participe à l'activation de cette voie dans l'ovaire, puisque la famille des protéines RSPO est déjà

connue comme activatrice de la même voie que WNT4. D'autre part, si la voie *βcatenin* est activée de façon ectopique dans les gonades XX *Rspo1* *-/-*, le développement sexuel des souris est normal, ce qui confirme bien que RSP01 agit par cette voie dans l'ovaire (Chassot et al., 2008). Un autre point important de cette étude est que, alors que *R-spondin1* est toujours exprimé dans les gonades XX *Wnt4* *-/-*, dans les gonades XX *Rspo1* *-/-* *Wnt4* ne l'est plus (Tomizuka et al., 2008). Cela indique que l'expression de *Wnt4* dépend de *R-spondin1* dans la signalisation régissant le développement ovarien.

WNT4 est également un activateur de la voie de signalisation WNT/*βcatenin* comme mentionné dans le paragraphe précédent. Chez l'homme, la duplication d'une partie de la région proximale du chromosome 1 qui contient le gène *WNT4* a été identifiée chez des individus XY présentant des défauts de masculinisation (Jordan et al., 2001). Chez la souris, son expression est retrouvée dans les gonades XX et XY, puis à partir de 11.5 *jpc* elle est maintenue uniquement dans la gonade XX (Vainio et al., 1999). Ce gène, tout comme *R-spondin1*, est exprimé dans les cellules somatiques de la gonade et sa délétion entraîne une masculinisation partielle des gonades et du tractus génital chez la souris (Vainio et al., 1999).

FOXL2 est un autre facteur essentiel à la différenciation des cellules de la granulosa. Chez la femme, des mutations hétérozygotes non-sens de *FOXL2* provoquent le syndrome BPES (Blepharophimosis Ptosis Epicanthus inversus Syndrome) qui est caractérisé par des anomalies des paupières associées dans certain cas à une insuffisance ovarienne prématurée due à une déficience de la formation des follicules (Crisponi et al., 2001). Chez la souris, *Foxl2* est exprimé dans les cellules de la pré-granulosa dès 12.5 *jpc* et les souris femelles mutées pour ce gène présentent des défauts de maturation des follicules (Schmidt et al., 2004; Uda et al., 2004). Ceux-ci s'arrêtent entre les stades primordiaux et primaires, puis ensuite dégénèrent. *Foxl2* est également important pour le maintien des cellules de la granulosa tout au long de la vie adulte de l'individu. La perte de *Foxl2* au stade adulte entraîne un phénotype de transdifférenciation de l'ovaire en testicule avec l'activation de *Sox9* (Uhlenhaut et al., 2009). Enfin, *Foxl2* est également important pour la folliculogénèse puisque après la naissance les ovaires des souris *Foxl2* *-/-* présentent des cellules de la granulosa de forme aplatie, caractéristiques des follicules primordiaux. Les follicules ne peuvent pas devenir matures en l'absence de

prolifération des cellules de la granulosa, ce qui résulte en atrophie ovarienne (Uda et al., 2004).

2) Le follicule ovarien est l'unité fonctionnelle du système reproductif femelle. Il est constitué d'un seul et unique ovocyte entouré de cellules somatiques de la granulosa et de cellules de la thèque. Les follicules primordiaux sont les précurseurs des follicules matures et sont formés autour de la naissance quand les cellules pré granulosa envahissent les clusters de cellules germinales. A ce moment, les cellules germinales isolées sont encerclées par les cellules de la pré-granulosa et forment des follicules primordiaux. La formation des follicules est fortement dépendante de la présence des cellules germinales (Guigon et al., 2005; Guigon & Magre, 2006), puisque les follicules primordiaux ne se forment pas en l'absence de celles-ci. Après la formation des follicules primordiaux, une fine couche de matrice extracellulaire est déposée autour de chaque follicule et crée un environnement approprié à la maturation des ovocytes. Les follicules primordiaux se situent principalement dans la zone externe de l'ovaire appelée cortex ovarien.

La maturation folliculaire passe par différentes étapes (figure 4). Tout d'abord, les follicules primordiaux se forment 1-2 jours après la naissance chez la souris. Ensuite les follicules pré-antraux se développent indépendamment des hormones responsables de l'ovulation, les gonadotropines. A partir du stade de follicule secondaire, une couche de cellules de la thèque s'ajoute autour de la membrane basale du follicule. A la puberté, la FSH (Follicle stimulating hormone), sécrétée par l'hypophyse, induit la prolifération et la survie des cellules de la granulosa, puis l'ovulation a lieu suite à un pic de LH (luteinizing hormone), également sécrétée par l'hypophyse. Après l'ovulation, les cellules de la thèque et de la granulosa se différencient pour former le corps jaune.

3) L'environnement somatique de l'ovaire doit évoluer au fur et à mesure de la maturation des follicules. Quand un follicule passe de l'étape de follicule primordial au follicule primaire, les cellules pré granulosa qui l'entourent doivent aussi se différencier en cellules de la granulosa matures. Cette différenciation est stimulée par des facteurs sécrétés par l'ovocyte. La morphologie fibroblastique des cellules de la pré-granulosa change alors et devient cuboïdale et leur statut quiescent devient

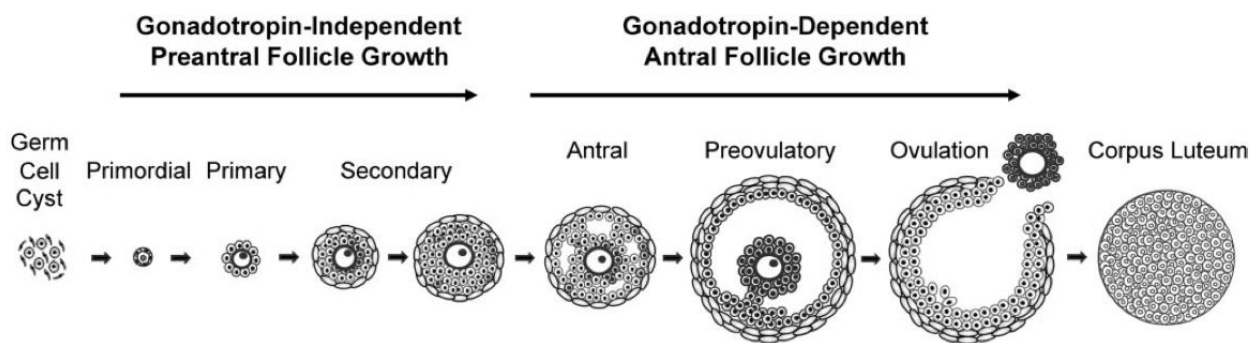


Figure 4: Classification des étapes majeures de la folliculogénèse chez les mammifères.

Les follicules primordiaux se forment 1-2 jours après la naissance chez la souris et *in utero* chez l'humain. Le développement au stade pré-antral est indépendant des gonadotropines. A partir du stade de follicule secondaire, une couche de cellules de la thèque se forme autour du follicule. A la puberté, la sécrétion de FSH induit la prolifération et la survie des cellules de la granulosa. L'ovulation du follicule dominant a lieu suite à un pic de sécrétion de LH. Après ovulation, les cellules de la granulosa et de la thèque se différencient encore et forment le corps jaune (corpus luteum).

prolifératif. *Foxl2* est un facteur déterminant de ces changements (Schmidt et al., 2004). Les cellules de la granulosa commencent alors à sécréter des facteurs importants pour le développement folliculaire tels que SCF (stem cell factor) et AMH (Anti-Müllerian hormone). Les ovocytes dans les follicules primaires secrètent aussi des facteurs importants pour le développement folliculaire tels que GDF9 (growth differentiation factor 9), de la famille du TGF β (Hussein et al., 2005).

Le recrutement et la maturation des cellules de la thèque se fait après la spécification des cellules de la granulosa. Les cellules de la thèque sont des cellules mésenchymateuses responsables de la production d'androgènes et sont donc indispensables pour le développement folliculaire. Elles entourent le follicule au stade primaire mais ne commencent pas la production d'androgènes avant le stade secondaire ou pré-antral (Gelety & Magoffin, 1997). L'origine de ces cellules n'est pas définie à l'heure actuelle, principalement parce que nous ne connaissons pas de marqueurs spécifiques de ces cellules. La théorie la plus répandue au sujet de l'origine de ces cellules est qu'elles proviennent du stroma ovarien d'où elles sont recrutées grâce à des facteurs sécrétés par les follicules. La possibilité qu'elles proviennent de cellules du mésonephros ayant migré à l'intérieur de l'ovaire avant 11.5 *jpc* ou après 16.5 *jpc* ne peut être exclue (Ungewitter & Yao, 2013).

Plusieurs facteurs sécrétés par les ovocytes et les cellules de la granulosa contrôlent la différenciation des cellules précurseurs des cellules de la thèque: l'*insulin-like growth factor* (IGF1), le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), SCF/KIT et les membres de la famille du TGF β , AMH et GDF9 (Young & McNeilly, 2010). Un phénotype des cellules de la thèque important a été observé chez les souris mutées pour le gène GDF9: les follicules des ovaires déficients en *Gdf9* ne recrutent pas de cellules de la thèque et donc ne mûrissent pas au-delà du stade de follicule primaire 3b (Elvin et al., 1999). Les cellules de la thèque ont 2 fonctions principales: Elles sécrètent des androgènes indispensables à la production d'œstrogènes et elles contribuent à la formation du système vasculaire qui nourrit les follicules en croissance.

Chapitre II : *R-spondin1* et la voie WNT/ β catenin

Les R-spondins font partie de la famille des protéines contenant un TSR-1 (thrombospondin type 1 repeat). Le préfixe R (pour *roof plate*) est dérivé de l'expression du gène qui code pour la *R-spondin1* murine. Ce gène est exprimé dans le tube neural entre le jour 10 et 12 *jpc*, dans la région entre le neuro-épithélium et le "roof plate" (Kamata et al., 2004). En plus de la présence du domaine TSR-1, les R-spondins sont caractérisées par la présence d'une région C-terminale avec des amino-acides chargés positivement et de deux domaines *furin-like*, riches en cystéines près de la région C-terminale de la protéine mature. Les premiers rôles des membres de la famille des R-spondins ont été démontrés sur une période de 4 ans : *R-spondin3* a été décrite en 2002 (Chen et al., 2002), alors que *R-spondin1* (Kamata et al., 2004) et *R-spondin2* ont été caractérisées en 2004. Finalement, *R-spondin4* a été caractérisée en 2006 (Blaydon et al., 2006). Les R-spondins des mammifères sont similaires du point de vue de la structure de leur gène et de leurs domaines protéiques. Chez l'homme les 4 membres de cette famille ont une homologie de 40% à 60% en acides aminés (figure 5).

Des homologues des R-spondins sont présents chez tous les vertébrés et chez certains invertébrés. Cependant, aucun homologue n'est retrouvé chez *Drosophila* ou *Caenorhabditis* (de Lau et al., 2012). En considérant la distribution phylogénétique, un gène ancêtre des R-spondins était probablement présent chez les ancêtres des deutérostomes et deux duplications successives de ce gène primitif auraient généré la diversité des R-spondins observée aujourd'hui (de Lau et al., 2012).

Des analyses fonctionnelles des protéines R-spondins utilisant un rapporteur WNT dans des cellules 293T, ont montré un lien avec la voie WNT/ β catenin canonique (Kazanskaya et al., 2004). Cette voie joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation et le maintien des cellules souches. L'activation de la voie est initiée quand des protéines sécrétées de la famille des WNT se lient aux récepteurs *Frizzled* (Fzd) et aux co-récepteurs LRP5-6 (low-density lipoprotein receptor related protein 5 or 6) (de Lau et al., 2012). A ce niveau, la voie est contrôlée par plusieurs antagonistes extracellulaires (figure 6). Les R-spondins ont un effet potentialisant sur WNT et l'analyse des domaines protéiques a montré

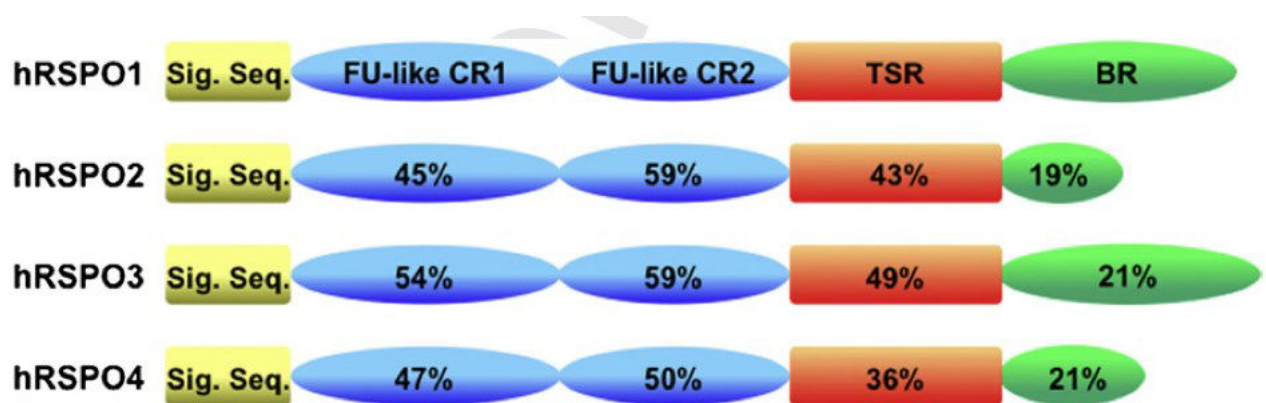


Figure 5: La famille des R-spondins. Les 4 membres de la famille des R-spondins possèdent un peptide signal au niveau du domaine N terminal (Sig-Seq, jaune), 2 domaines furine-like riches en cystéine (FU-like CR1 et 2, bleu) qui permettent l'activation de la voie β -caténine, un domaine thrombospondine (TSR, rouge) et un signal putatif de localisation nucléaire en C-terminal (vert). Les pourcentages d'acides aminés identiques dans chaque domaine montre un pourcentage d'homologie relativement élevé. (Jin & Yoon, 2012).

que les répétitions de furine sont essentielles et suffisantes pour entraîner cet effet. Les premières expériences *in vivo* démontrant cela ont été réalisées sur des jeunes embryons de grenouille. Elles montrent que la déplétion de *R-spondin2* dans un blastomère au stade huit cellules entraîne la désorganisation des somites et la réduction des myotomes, alors que la déplétion au stade de gastrula a entraîné des défauts au niveau du développement musculaire (Kazanskaya et al., 2004). Des résultats similaires ont été reportés chez le poulet et les mammifères (Borycki & Emerson, 2000)(Cossu & Borello, 1999). L'effet potentialisant des R-spondins sur l'activité de la voie de signalisation WNT/ β -catenin a également été démontré dans des expériences de tumeurs induites (Lowther et al., 2005). Dans ces cas, la voie est à un niveau d'activité élevé, dû au fait que des sites d'insertion du virus tumoral ont été retrouvés dans les gènes de la famille des *Wnt*, ainsi que dans le gène de *R-spondin2*. 10% des carcinomes intestinaux non dépendants d'APC sont dus à des fusions de *R-spondin2* ou *R-spondin3* (Seshagiri et al., 2012).

1. La voie de signalisation *Wnt*

Les WNTs, protéines riches en *Cys*, sont très conservées durant l'évolution (Willert & Nusse, 2012). Il existe 19 gènes identifiés chez l'humain (Kikuchi et al., 2011). Chaque WNT est capable de s'associer à plusieurs récepteurs différents, en fonction du contexte cellulaire, et d'activer plusieurs voies de signalisation en aval. Ces voies de signalisation sont classées en 2 catégories : la voie canonique (dépendante de β catenin) et les voies non-canoniques (indépendantes de β catenin). Cette classification a cependant ses limites puisque au sein de la signalisation WNT, qu'elle soit canonique ou non-canonique, plusieurs sous-voies sont activées selon différents contextes cellulaires (Kikuchi et al., 2011). Chaque WNT active préférentiellement soit la voie canonique, soit une voie non-canonique, mais cela dépend également des récepteurs présents. Il est donc impossible de classer les différents WNTs dans des groupes en fonction de la voie qu'ils activent, puisque qu'ils ont plus de 15 récepteurs et co-récepteurs différents qui, selon les combinaisons des isoformes et des récepteurs, déterminent quelle voie en aval sera activée (figure 6).

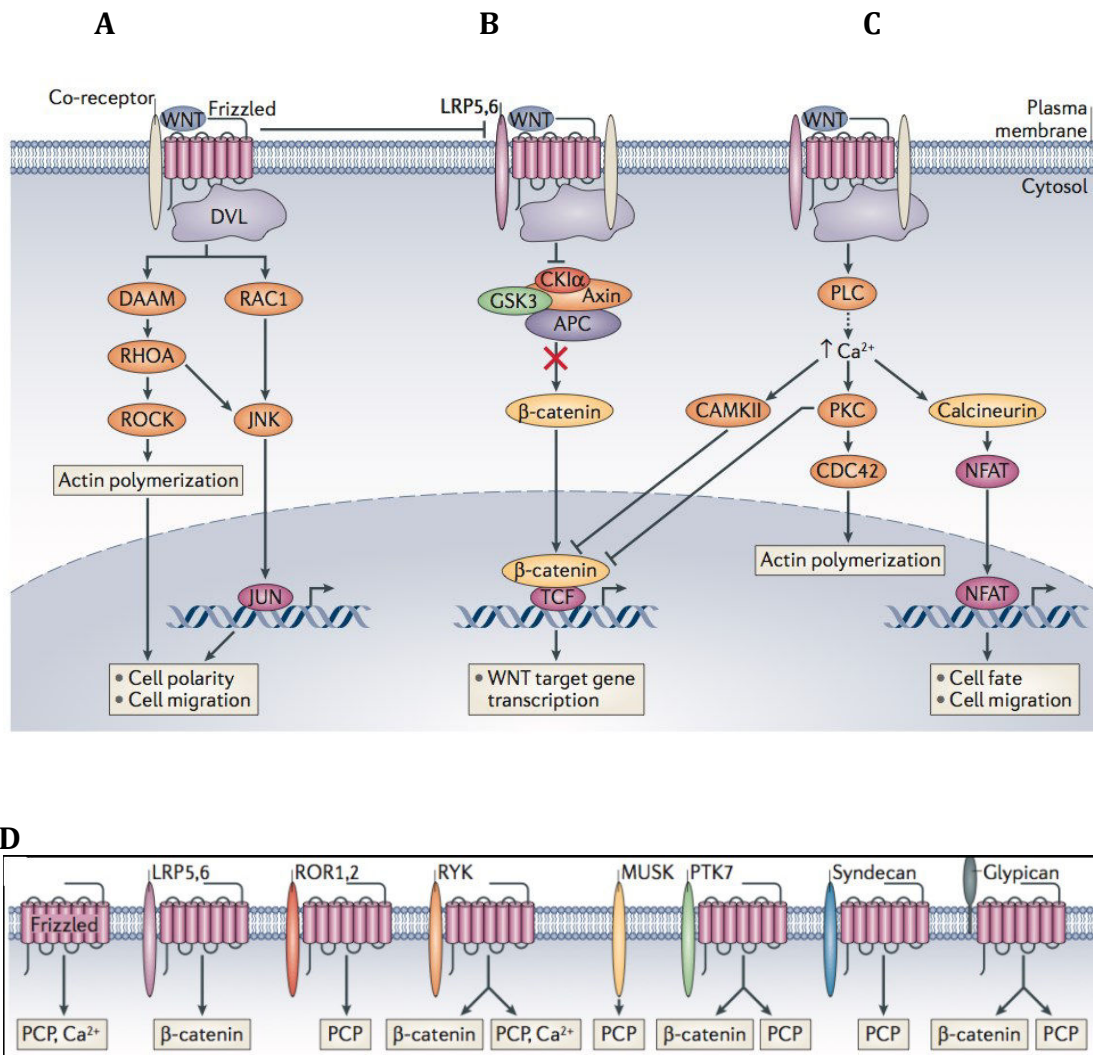


Figure 6: Les voies de signalisations WNT. Schéma simplifié des voies principales activées par un WNT spécifique. **A)** La voie de la polarité cellulaire planaire (PCP), qui conduit à l'activation des petites GTPases RHOA et RAC1 qui activent à leur tour la kinase RHO (ROCK) et la kinase JUN-N-terminale (JNK). Ceci conduit à la polymérisation de l'actine et la stabilisation des microtubules. Cette voie est donc principalement impliquée dans la régulation de la polarité cellulaire, de la motricité cellulaire et des mouvements morphogénétiques. **B)** La glycogène synthase kinase 3 (GSK3) phosphoryle β catenin, ce qui mène à sa dégradation. En la présence d'un ligand WNT, le complexe de dégradation comprenant la GSK3, la caséine kinase α (CKI α), l'Axine et l'adenomatosis polyposis coli (APC), est recruté à la membrane et est inactivé. Ceci permet à la β catenin de s'accumuler dans le cytoplasme et de passer par la suite dans le noyau pour activer ses gènes cibles. **C)** La voie WNT- Ca^{2+} active la kinase II dépendante de Ca^{2+} et de la calmoduline (CAMKII), la protéine kinase C (PKC) et la calcineurine. La calcineurine active le facteur nucléaire NFAT, qui régule à son tour la transcription de gènes qui contrôlent le devenir des cellules ainsi que leur migration. **D)** Récepteurs et co-récepteurs des 2 voies WNT principales. (Niehrs, 2012)

1.1 Voie canonique - β catenin dépendante

La voie β catenin-dépendante est celle qui est à ce jour la mieux caractérisée (Figure 6). Elle est activée par l'interaction de certains WNTs avec le récepteur Frizzled et LRP5 ou LRP6. La cascade moléculaire activée conduit à l'inhibition de GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) dont un des substrats clé est le co-activateur transcriptionnel β catenin. En absence de WNTs à la surface de la cellule, β catenin est phosphorylée puis dégradée par le protéasome. L'inactivation de β catenin se fait par un complexe de dégradation qui comprend, en plus de GSK3, APC (Adenomatosis Polyposis Coli), Axin et CK1 α (Caséine Kinase I α). En présence de WNT, et de l'activation de la voie, β catenin n'est pas phosphorylée et sa forme cytoplasmique stabilisée migre vers le noyau, où elle s'associe avec au moins deux facteurs de transcription pour réguler la transcription de gènes cibles, TCF (T Cell Factor) et LEF (Lymphoid Enhancer-binding Factor). Cette voie est surtout impliquée dans la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire (Reya & Clevers, 2005).

GSK3 est capable de réguler également d'autres substrats en aval des WNTs, dont les cyclines et le facteur d'initiation de traduction eIF2B. Ces substrats sont impliqués dans le cytosquelette et la régulation du cycle cellulaire. Des données récentes suggèrent que GSK3 peut dégrader des centaines de protéines en aval d'un signal WNT (Taelman et al., 2010).

1.2 Voies indépendantes de β catenin- Voies non-canoniques

La voie la plus étudiée et caractérisée dans cette catégorie est la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP) (figure 6A). Dans ce cas les récepteurs Frizzled activent une cascade qui comprend les petites GTPases RAC1 et RHOA, ainsi que la kinase JUN-N-terminal (JNK). Le résultat de l'activation de cette voie peut être des changements au niveau du cytosquelette, de la polarité cellulaire et de la migration cellulaire. L'activation transcriptionnelle de facteurs de transcription dépendants de JNK, tels que ATF2 (Activating Transcription Factor 2), puis l'activation de leurs

gènes cibles, peuvent résulter également de l'activation de la voie PCP (Simons & Mlodzik, 2008). Cette voie est surtout impliquée dans la régulation de la polarité cellulaire au cours des processus de morphogénèse.

La voie PCP et la voie canonique sont connues pour être antagonistes et cet antagonisme se situe partiellement au niveau ligand-récepteur. Les co-récepteurs de cette voie ne sont pas LRP5 ou LRP6 mais ROR et PTK7.

La seconde voie indépendante de β catenin est la voie WNT- Ca^{2+} (figure 7C). La fixation de WNT sur son récepteur active des protéines G trimériques *via* les récepteurs Frizzled, activant la phospholipase C (PLC), qui produit du diacylglycérol et de l'inositol-1,4,5- triphosphate ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$). Le $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ conduit à l'augmentation de Ca^{2+} dans la cellule et à l'activation d'effecteurs tels que la kinase II, dépendante de Ca^{2+} et de la calmoduline (CAMKII), la calcineurine et la protéine kinase C (PKC). Ces dernières activent finalement le régulateur transcriptionnel "*nuclear factor associated with T cells*" (NFAT) qui contrôle la destinée cellulaire et la migration. Cette voie est impliquée dans les cancers, l'inflammation et la neurodégénérescence (De, 2011).

Mis à part ces voies principales, il en existe plusieurs autres qui passent par les récepteurs Frizzled ou encore d'autres co-récepteurs différents qui ne seront pas discutées ici.

2. Rôle des membres de la famille des R-spondins

La voie de signalisation WNT/ β -catenin est importante dans beaucoup de processus développementaux durant l'embryogenèse dans le monde animal. L'effet des R-spondins de potentialiser cette voie implique leur importance dans différents processus.

***R-spondin 1* : Phénotype d'inversion de sexe.**

Des mutations du gène *RSPO1* induisent l'apparition d'un syndrome très rare chez l'humain (1/20.000 individus) qui combine une inversion de sexe de type mâle XX, SRY-indépendante avec une hyperkératose palmoplantaire (PPK) et une prédisposition aux carcinomes des cellules squameuses (SCC). Parma et al., (2006) ont décrit une famille italienne avec 11 individus 46, XX qui étaient phénotypiquement des hommes. L'étude génétique de cette famille, complétée de celle d'un autre patient venant d'une autre famille sans parenté, a permis d'identifier des mutations dans le gène *RSPO1*. L'inversion de sexe est due à l'absence d'expression de *R-spondin1* dans les gonades des individus XX affectés, puisque normalement une augmentation de son expression est observée à 11.5 *jpc* dans les gonades XX. Ceci a été confirmé avec l'étude des souris invalidées pour *R-spondin1*, comme décrit au chapitre précédent.

Chez les mammifères, le sexe de l'individu est déterminé par la présence du programme génétique mâle ou femelle qui dirige le développement du testicule ou de l'ovaire. Bien qu'il ait longtemps été considéré que la voie de différenciation femelle est une voie par défaut, il est maintenant connu que cette voie a également besoin d'être activée. *R-spondin1* avec *Wnt4* en sont les activateurs connus à ce jour. De plus *R-spondin1* montre un profil d'expression spécifique de la femelle chez les vertébrés, dont le poulet et la tortue (Smith et al., 2008), ce qui indique un rôle conservé dans la détermination sexuelle femelle.

Il a aussi été montré que *R-spondin1* est impliqué dans le développement de la glande mammaire, chez la souris (Chadi et al., 2009), et dans l'angiogenèse chez le

poisson zèbre (Gore et al., 2011). Enfin *R-spondin1* est un régulateur négatif de la genèse *de novo* des cellules β dans le pancréas (Chahal et al., 2014).

***R-spondin2* : développement des membres, des poumons et des follicules pileux**

Il y a quatre modèles murins invalidés pour *R-spondin2*, générés à ce jour. Ces modèles présentent des malformations craniofaciales, des membres et des reins et meurent à la naissance à cause de problèmes respiratoires (Aoki et al., 2008; Bell et al., 2008; Nam, Park, et al., 2007; Yamada et al., 2009). Une de ces études a démontré que le phénotype d'une lignée transgénique présentant des défauts pulmonaires ainsi que des membres, est dû à l'insertion du transgène dans le *locus* de *R-spondin2*. Ceci a pour résultat la production d'un transcrit tronqué dans l'exon 3, ce qui empêche *R-spondin2* d'interagir avec LRP6 et d'activer la voie WNT/ β catenin (Bell et al., 2008). Les femelles hétérozygotes pour ces mutations du gène *R-spondin2* présentent une stérilité dépendante de l'âge et qui s'accompagne du développement d'ovaires polykystiques (Bell et al., 2008; Nam et al., 2007).

Les phénotypes du squelette des modèles murins invalidés pour *R-spondin2* a permis d'établir un lien entre ce gène et la voie β catenin canonique (Yamada et al., 2009). Ce lien a été consolidé avec l'étude des phénotypes pulmonaires de ces modèles qui ont permis de définir que RSPO2 active la voie WNT/ β catenin *via* le récepteur LRP6 durant le développement des poumons (Bell et al., 2008).

Un lien de redondance a également été établi entre *R-spondin2* et *R-spondin3* durant le développement des membres postérieurs puisque le phénotype s'accroît après l'inactivation de *R-spondin3* en plus de *R-spondin2* (Neufeld et al., 2012).

R-spondin2 a également été identifié comme un variant génétique clé pour le pelage canin dans une étude d'association pangénomique (Cadieu et al., 2009). Enfin il a été montré qu'il est impliqué dans la cicatrisation cutanée et la formation des keloïdes en induisant la prolifération des kératinocytes (Chua et al., 2011).

***R-spondin3* : développement du placenta.**

L'étude des modèles murins *knock-out* pour *R-spondin3*, a montré son implication dans le développement placentaire et vasculaire. Ces souris meurent à 10 *jpc* à cause des défauts dans le développement du placenta (Aoki et al., 2007). Plus spécifiquement, *R-spondin3* aurait un rôle important dans l'interaction entre le chorion et l'allantoïde.

Chez *Xenopus*, l'inactivation du gène *R-spondin3* par injection d'un morpholino, a conduit à trois défauts. L'apparition d'un œdème ventral ainsi que des défauts vasculaires chez les têtards, semblent être dépendants de la voie WNT/ β catenin (Kazanskaya et al., 2008), alors que l'interruption de la gastrulation et la malformation du cartilage de la tête (Ohkawara et al., 2011) semblent régulés par la voie WNT/PCP.

De plus il a été récemment montré que *R-spondin3* pourrait participer à la régulation de l'homéostasie énergétique dans le cerveau chez le rat. Le récepteur impliqué dans ce cas est LGR4 et *R-spondin1* aurait également joué le même rôle que *R-spondin3* (Li et al., 2014). De plus, des études d'association pangénomique sur différentes populations humaines ont établi un lien entre la distribution corporelle du tissu adipeux et *R-spondin3* (Schleinitz et al., 2014).

***R-spondin4* : développement des ongles**

Le gène *RSPO4* est impliqué dans la formation des ongles. Les mutations de ce gène entraînent une anonychie/hyponychie, c'est-à-dire une absence ou une hypoplasie sévère des ongles (Blaydon et al., 2006), sans anomalie majeure des os (Baran & Kechijian, 2001). Le lien entre *R-spondin4* et l'anonychie chez l'humain a été fait grâce à plusieurs études d'association pangénomique (Brüchle et al., 2008; Seitz et al., 2007; Wasif & Ahmad, 2013). Les altérations génétiques observées ont pour résultat un défaut de synthèse de *R-spondin4* fonctionnelle.

Les souris mutantes pour *R-spondin2*, décrites précédemment ont des défauts également au niveau des griffes il reste donc à étudier un lien potentiel entre *R-spondin2* et *R-spondin4* chez les individus présentant une anonychie/hyponychie (Bell et al., 2008; Nam, Park, et al., 2007).

3. Récepteurs des R-spondins

L'identification des composants membranaires transmettant le signal des R-spondins à l'intérieur de la cellule est passée par plusieurs étapes d'essais et d'erreurs. Il a été proposé, dans des rapports un peu contradictoires que R-spondin se lie aux Fzds, LRPs, au récepteur Kremen et aux WNTs (Nam et al., 2007; Wei et al., 2007). Le lien entre les LGRs (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled Receptors) et les R-spondins s'est fait définitivement en 2011. Une série de ligands potentiels des LGRs ont été testés sur des lignées cellulaires surexprimant LGR4 et LGR5 (Carmon et al., 2011). En ne trouvant aucune molécule qui se lie à ces récepteurs, les auteurs se sont tournés vers les R-spondins en se basant sur leur rôle connu d'activateurs de la voie WNT. Plusieurs expériences qui ont suivi ont montré une très haute affinité entre les R-spondins et LGR4 et LGR5. De plus, l'inactivation du gène *Lgr4* dans ces mêmes lignées cellulaires conduit à une baisse de la sensibilité de ces cellules à R-spondin. Cet effet est inversé par LGR4, LGR5 et LGR6 mais pas par d'autres LGRs. Les 4 R-spondins se lient avec une haute affinité à ces trois récepteurs LGR. Ceci mène à une augmentation de la phosphorylation de LRP5 et LRP6 et à la stabilisation de β catenin (Carmon et al., 2011; W. de Lau et al., 2011; Glinka et al., 2011).

Il a également été proposé que Syndecan-4 est le récepteur de R-spondin3 dans la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP) (Ohkawara et al., 2011).

Les LGRs semblent être associés avec le complexe FZD/LRP. Cela laisse supposer que l'action de R-spondin sur la voie de signalisation WNT/ β catenin est transmise *via* les co-récepteurs LRP5/6 et Frizzled.

Plusieurs études ont été menées afin de déterminer la localisation des récepteurs LGR4, LGR5 et LGR6 et leur rôle physiologique pendant l'embryogenèse. Chez la souris, *Lgr4* est très fortement exprimé dans le cartilage, les reins, les grandes surrénales, le tractus génital, les yeux et les cellules du système nerveux (Hoshii et al., 2007; Kato et al., 2006; Van Schoore et al., 2005). *Lgr5* a également un patron d'expression complexe durant l'embryogenèse (Morita et al., 2004). Il est retrouvé dans quelques rares cellules souches de l'œil adulte, de la glande mammaire, de l'intestin, de la peau et des gonades (Barker et al., 2008; Flesken-

Nikitin et al., 2013). L'expression de *Lgr6* se situe principalement dans les placodes du follicule pileux (Morris et al., 2004), dans quelques cellules du cerveau, de la glande mammaire, ainsi que dans les voies respiratoires (Leushacke & Barker, 2012).

La signalisation *R-spondin* via les récepteurs LGR agit également dans plusieurs tissus adultes et, plus exactement, dans le processus d'auto-renouvellement de ceux-ci. Ceci a été particulièrement étudié dans les muqueuses du tractus digestif, tel que l'estomac, l'intestin grêle et le colon. Plusieurs études ont contribué à démontrer que *Lgr5*, un gène cible de WNT/ β -catenin, est un marqueur unique des cellules souches qui contribuent à l'auto-renouvellement de ces tissus (Barker et al., 2008). *Lgr4* est exprimé dans ces cellules souches mais également dans toutes les cellules progénitrices. Les cellules souches LGR5 positives de l'intestin sont capables d'être maintenues *in vitro* et d'induire la formation d'organoïdes (Sato et al., 2009). Cependant, ces cultures nécessitent non seulement LGR5 mais également R-spondin et WNT. De plus, la voie de signalisation WNT/R-spondin est impliquée dans l'établissement du cycle du follicule pileux et reste très importante pour l'activité des cellules souches tout au long de la vie (Lowry et al., 2005; van Genderen et al., 1994).

4. Mode d'action

Jusqu'à présent, mis à part le fait qu'il est établi que les R-spondins se lient aux récepteurs LGR (Wang et al., 2013), leur effet sur l'activation de la voie WNT/ β catenin n'est pas totalement comprise. Il a été démontré récemment que cet effet potentialisant des R-spondins passe par l'expression de 2 autres gènes cibles de la voie de signalisation *Wnt* : *Rnf43* et *Znrf3*. Ces 2 gènes sont hautement homologues et codent pour des ubiquitines ligases E3. Ces enzymes ont été identifiées dans les cellules souches intestinales (Koo et al., 2012). Leur action consiste en l'ubiquitination des lysines de la boucle cytoplasmique des domaines 7TM du récepteur Frizzled, ce qui a pour résultat l'endocytose des récepteurs de *Wnt*. Cela résulte en l'inactivation de cette voie de signalisation.

Plusieurs études ont permis d'établir le lien entre ces 2 ligases et l'effet potentialisant de *R-spondin*/LGR sur la voie WNT/ β catenin . Plus précisément une

interaction spécifique entre R-spondin et ZNFR3 a été observée et a permis d'établir un modèle dans lequel LGR5 et RNF43/ZNFR3 se lient par le biais des domaines *Furin-like* de *R-spondin*. Cette interaction conduit à l'endocytose de RNF43/ZNFR3. Le complexe R-spondin/LGR5 neutralise donc RNF43/ZNFR3, permettant ainsi le maintien des récepteurs Frizzled à la surface de la cellule. Ceci conduit à l'augmentation de la signalisation due au signal de WNT (de Lau et al., 2014).

Chapitre III: Gène *Sox9*, fonction et gènes cibles

1. La famille des *Sox*

Le mystère de la détermination sexuelle chez les mammifères a été levé en 1990 avec la découverte de *SRY/Sry* (de l'anglais *Sex-determining Region of Y chromosome*) (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). *Sry* code pour une protéine avec un domaine HMG (pour *high-mobility-group*) de fixation à l'ADN. L'expression de cette protéine est nécessaire et suffisante pour obtenir une différenciation de type male (Koopman et al., 1991). Cette découverte a permis tout d'abord de commencer à décoder les bases moléculaires de la détermination du sexe, mais elle a également permis d'identifier toute une famille de protéines qui ont des fonctions très importantes chez les métazoaires. Dans les années qui ont suivi cette découverte, 20 gènes "*Sry-Related HMG box*" (*Sox*) ont été identifiés chez les vertébrés (Denny et al., 1992; Wright, Snopek, & Koopman, 1993).

La famille des *Sox* comprend 9 groupes chez les mammifères, et sont classés dans ces groupes en fonction du degré de similarité des protéines à l'intérieur et en dehors de leur domaine HMG. Plus précisément, *Sox9* fait partie du groupe E, avec *Sox8* et *Sox10*. Des mutations de ces gènes chez l'humain sont responsables de syndromes cliniques sévères, tels que des troubles du développement sexuel (*SRY* et *SOX9*), la dysplasie campomélique (*SOX9*) (Foster et al., 1994) et la maladie de Waardernburg et Hirschsprung (*SOX10*) (Pingault et al., 1998; Southard-Smith, Kos, & Pavan, 1998).

2. Expression de *Sox9*

Un processus essentiel dans la différenciation testiculaire est l'induction de l'expression de *Sox9* par *Sry*. Chez l'humain, les mutations hétérozygotes de *SOX9* induisent un syndrome de dysplasie campomélique qui est souvent associé avec une inversion de sexe chez les individus XY (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994). De plus, une duplication de *SOX9* a été mise en évidence dans une pathologie d'inversion

de sexe chez un individu XX (Huang et al., 1999). Des phénotypes similaires ont été décrits chez la souris : l'expression constitutive de *Sox9* dans la gonade induit une inversion de sexe des individus XX (mâles XX) (Bishop et al., 2000). De plus, l'expression ectopique de *Sox9* sous le contrôle du promoteur de *WT1* induit également une inversion de sexe chez les individus XX transgéniques (mâles XX) (Vidal et al., 2001). Les souris XY, qui portent les allèles endogènes de *Sox9* flanqués de 2 sites *loxP* (*Sox9^{lox/flox}*), présentent une inversion de sexe (femelles XY) quand les 2 allèles sont excisés à l'aide de transgènes *Cre* spécifiques s'exprimant dans les tissus somatiques de la gonade, tels que la *Sf1-Cre* et la *cytokeratin19-Cre* (*Ck19-Cre*) (Barrionuevo et al., 2009; Chaboissier et al., 2004). Chez la souris, des études ont permis de démontrer que l'expression de *Sox9* à un très faible niveau est activée par SF1 dans les deux sexes à 10.5 *jpc* et elle est ensuite augmentée juste après l'activation de *Sry* chez les individus XY.

Suite à ces études, une région de 3.2 kb, nommée "*testis-specific enhancer of Sox9*" (TES) a été identifiée. SRY et SF1 se lient directement à plusieurs sites de TES et activent le promoteur de *Sox9*. La séquence TES est retrouvée en amont de *Sox9* chez d'autres vertébrés également, mais sa conservation diminue rapidement avec la distance évolutive. La question se pose alors de savoir si la fonction de TES est conservée entre les espèces. Aucune activité de la séquence TES humaine n'a été observée dans le testicule de modèles de souris transgéniques (R Sekido & Lovell-Badge, 2013). Plusieurs autres études sur des cas de patients humains XY présentant des dysgénésies gonadiques n'ont pas permis d'identifier de mutations liées à la séquence TES. Il serait donc possible qu'il y ait d'autres séquences régulatrices en amont du gène *SOX9* chez l'humain.

Enfin, les protéines SOX ont peu d'effet par elles mêmes sur la transcription de leurs gènes cibles. Elles fonctionnent très souvent en synergie avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple, SRY régule l'expression de *Sox9* avec l'aide de SF1. Ceci a pour résultat des inversions de sexe de type femelle XY dans des cas de mutations de *Sf1* (Luo, Ikeda, & Parker, 1994).

3. Gènes cibles de *Sox9*

Peu après l'expression de *Sox9*, deux boucles de régulation se mettent en place via FGF9 et PGD₂. Plus précisément, SOX9 active directement ou indirectement l'expression de *Fgf9* et FGF9 à son tour maintient l'expression de *Sox9* en passant par le récepteur FGFR2 (Y. Kim et al., 2006). Des mutations de perte de fonction de *Fgf9* ou *Fgfr2* conduisent à une réduction de l'expression de *Sox9* qui se traduit par une inversion de sexe chez les individus XY (Bagheri-Fam et al., 2008; Colvin et al., 2001). SOX9 se lie directement au promoteur du gène *Ptgds* qui code pour la prostaglandine D synthase qui conduit à la production de PGD₂. La signalisation autocrine et/ou paracrine de PDG₂ promeut la translocation de SOX9 dans le noyau et facilite ainsi la différenciation des cellules de Sertoli (Malki et al., 2005). Dans les gonades de souris XY invalidées pour le gène *Ptgds*, l'expression de *Sox9* est réduite et il semble que sa translocation vers le noyau soit retardée. Cependant il resterait suffisamment d'expression de SOX9 pour permettre la différenciation testiculaire (Moniot et al., 2009).

Sox8 et *Sox10* sont également exprimés dans les gonades XY, mais leur niveau d'expression reste inférieur à celui de *Sox9* (Polanco et al., 2010). L'expression de *Sox8* est dépendante du niveau de SOX9 puisqu'elle est réduite dans les gonades des souris XY *Sox9^{flox/flox}; Sf1-Cre* à 13.5 *jpc* (Barrionuevo et al., 2009). De plus, l'expression de *Sox9* n'est pas modifiée dans les gonades des souris XY *Sox8^{-/-}* (Sock et al., 2001), ce qui suggère donc que *Sox8* se situe en aval de *Sox9*. Les souris invalidées pour *Sox8* présentent un défaut de spermatogenèse qui conduit à la stérilité à 5 mois attribuée à des défauts de la barrière hémato-testiculaire (O'Bryan et al., 2008). De plus, *Sox8* et *Sox9* contrôlent l'expression de *Sox10* (Georg, Barrionuevo, Wiech, & Scherer, 2012). Aucune fonction cependant de *Sox10* n'a été décrite dans le développement et la fonction testiculaire (Britsch et al., 2001; Pingault et al., 1998). Enfin, chez l'humain, *SOX10* se situe à 22q13, où se trouve un locus responsable d'inversion de sexe de type 46, XX quand il est dupliqué (Seeherunvong et al., 2004). L'expression ectopique de *Sox10* sous le contrôle du promoteur de *WT1* induit une inversion de sexe chez les souris XX (mâles XX) (Polanco et al., 2010).

D'autres cibles directes de SOX9 ont été identifiées. SOX9 est requis pour l'activation du gène de l'hormone anti-Müllerienne (*Amh*) qui code pour une molécule TGF- β -like qui est sécrétée par les cellules de Sertoli fœtales. Des mutations du site de liaison de SOX9 sur une région régulatrice en 5' de *Amh*, conduit à l'apparition de pseudo-hermaphroditisme avec absence de transcription d'*Amh* (Arango et al., 1999). Ce site de liaison est enrichi pour SOX9 dans des essais de ChIP (Ryohei Sekido & Lovell-Badge, 2008). L'expression d'*Amh* se fait également grâce à SF1 et WT1(-KTS), par leurs sites de liaison dans la même région (Nachtigal et al., 1998) et par GATA4 (Salmon et al., 2005).

4. Fonction de Sox9 dans l'ovaire

Les cellules de la granulosa et les cellules de Sertoli se différencient à partir de précurseurs communs (Albrecht & Eicher, 2001) et ces deux types cellulaires expriment AMH après la naissance (Vigier et al., 1984)(Lasala et al., 2004). Des facteurs de transcription autres que SOX9, tels que SF1, GATA4 et SOX8 sont connus pour participer à la régulation de l'expression d'AMH dans la gonade embryonnaire mâle (Barrionuevo et al., 2009; Chaboissier et al., 2004; Viger et al., 1998). Ces facteurs sont exprimés également dans l'ovaire post-natal (Salmon et al., 2005). Dans la gonade femelle, SOX9 reste cytoplasmique pendant le début de l'embryogenèse. Son expression est ensuite rapidement réprimée dans l'ovaire murin (Kent et al., 1996; Morais da Silva et al., 1996). Plusieurs études effectuées sur l'expression de *Sox9* dans l'ovaire adulte ont montré que son expression n'est pas maintenue chez les mammifères, puisque la voie de signalisation WNT/ β catenin réprime l'expression de *Sox9* et *Fgf9* (P. Bernard et al., 2012; Maatouk et al., 2008). Une étude qui a utilisé des approches plus précises en regroupant des ovaires ayant des follicules à des stades similaires a démontré que *Sox9* est exprimé dans des cellules de la thèque interne du stade pré-antral au stade pré-ovulatoire. Ces cellules sont proches de la lame basale qui sépare les cellules de la granulosa des cellules de la thèque et n'ont pas d'activité stéroïdogène (Notarnicola et al., 2006). Elles sont potentiellement importantes pour la production de collagène ou de laminine qui constituent la lame

basale (Rodgers et al., 2003). Cependant, le rôle fonctionnel de SOX9 dans l'ovaire adulte reste à élucider.

Chapitre IV: L'ovaire adulte

Une des fonctions principales de l'ovaire est la reproduction de l'individu *via* la production d'ovocytes. La structure requise pour mener à bien cette fonction est le follicule ovarien, qui est l'unité fonctionnelle de l'ovaire. Chaque follicule est composé d'un ovocyte et des cellules somatiques de la granulosa qui l'entourent. Contrairement aux tissus d'autres organes, le développement de chaque follicule ovarien est unique et donc chaque follicule représente une unité fonctionnelle indépendante au sein de l'ovaire (McGee & Hsueh, 2000). L'ovaire adulte mature est composé à chaque instant donné d'un grand nombre de follicules qui sont tous à un stade de développement différent (figure 7)

1. Folliculogenèse

Une des premières études visant à comprendre comment est initiée la formation des follicules est celle de (Hirshfield, 1992) qui a proposé l'hypothèse de deux populations de follicules primordiaux dans l'ovaire post-natal de rat. A l'aide de marquages autoradiographiques des cellules somatiques dans la gonade embryonnaire, ces travaux démontrent que les cellules de la granulosa situées dans la zone médullaire de l'ovaire se développent à partir de progéniteurs quiescents durant la deuxième moitié de la vie embryonnaire. Les cellules de la granulosa du cortex ovarien dérivent par contre de cellules progénitrices qui se divisent de façon active. L'existence de ces deux populations différentes de cellules progénitrices suggère qu'il y a 2 populations différentes de follicules primordiaux dans l'ovaire de rat peu après la naissance. Les follicules de la zone médullaire entrent en croissance juste après leur formation alors que ceux du cortex ovarien peuvent croître tout au long de la vie de l'individu.

Une vingtaine d'années après ces premières expériences, une autre étude a apporté des résultats qui prouvent l'existence de ces 2 populations de follicules par le biais de l'expression de *Foxl2* dans ces deux populations à des stades différents du développement (Mork et al., 2012). Plus précisément, cette étude montre qu'à partir de 11.5 *jpc* et jusqu'à 14.5 *jpc*, des précurseurs des cellules de la granulosa qui sont

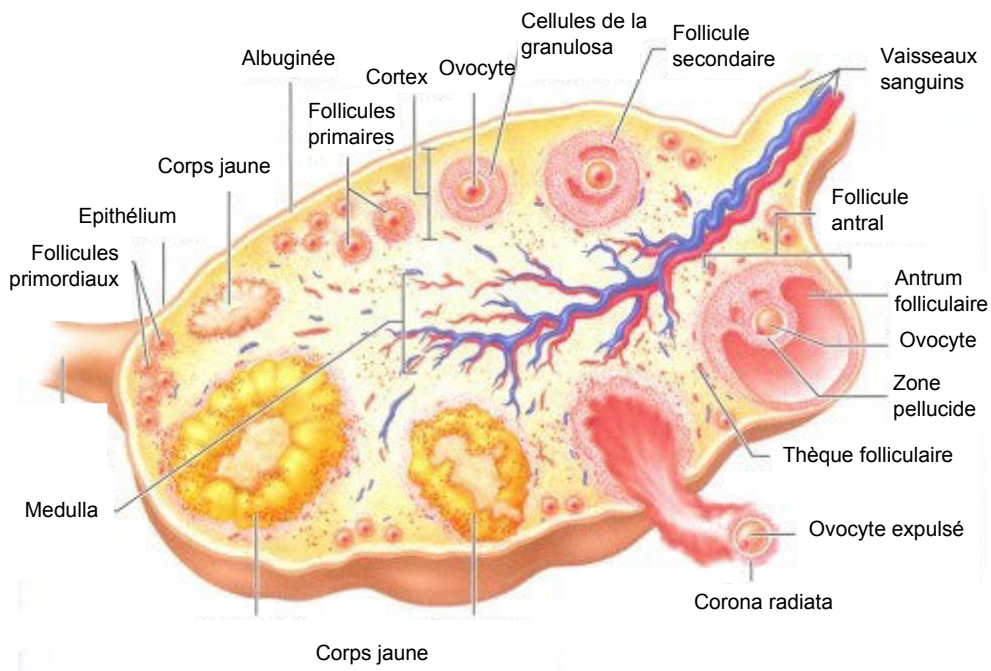


Figure 7: Structure de l'ovaire de souris adulte.

L'ovaire adulte peut être divisé en une zone corticale (cortex ovarien) et une zone médullaire (medulla ovarienne). Dans le tissu conjonctif lâche de la medulla ovarienne se trouvent les vaisseaux sanguins, alors que les ovocytes se trouvent dans la zone corticale à différents stade folliculaires. (<http://app-asap.over-blog.com/article-structure-de-l-ovaire-43833787.html>)

Foxl2 négatives migrent à l'intérieur de l'ovaire à partir de l'épithélium de la gonade embryonnaire. Ces précurseurs continuent de proliférer avant d'exprimer *Foxl2*, après quoi leur prolifération baisse de façon significative. Les cellules somatiques exprimant *Foxl2* restent quiescentes dans la zone médullaire de l'ovaire pendant le reste du développement embryonnaire et recommencent à proliférer juste après la naissance.

La seconde population de cellules précurseurs, qui prolifèrent de façon intense, commence à migrer à l'intérieur de l'ovaire à partir de 15.5 *jpc* jusqu'à P4 après la naissance. Cette deuxième population de cellules somatiques exprime *Foxl2* seulement après la formation des follicules primordiaux adultes, quelques jours après la naissance. Ces résultats appuient fortement l'hypothèse posée par Hirshfield, (1992) mais des limites techniques n'ont pas permis de suivre le destin de chaque vague de follicules après la naissance des individus.

Très récemment, une étude indépendante des précédentes a pu apporter beaucoup d'informations sur l'origine des deux populations de follicules primordiaux (Zheng et al., 2014). Grâce au modèle de souris *Foxl2-CreER^{T2}; mT/mG*, le devenir des cellules qui expriment *Foxl2* a été suivi. Après injection de tamoxifène aux mères gestantes à 16.5 *jpc*, les cellules qui expriment *Foxl2* passent de la fluorescence rouge (tbTomato/ *mT*) à la fluorescence verte (EGFP/ *mG*). Il a ainsi été observé que les cellules exprimant *Foxl2* participaient à la formation des follicules de la première vague de migration à P3 et P13 après la naissance. L'injection du tamoxifène à P5 permet de suivre les cellules *Foxl2* positives de la première vague de migration de la folliculogenèse, ainsi que celles qui participent à la formation des follicules primordiaux adultes. Ces résultats montrent bien qu'il y a deux vagues de migration des cellules précurseurs de la granulosa à l'intérieur de l'ovaire et donc deux classes de follicules primordiaux (figure 8).

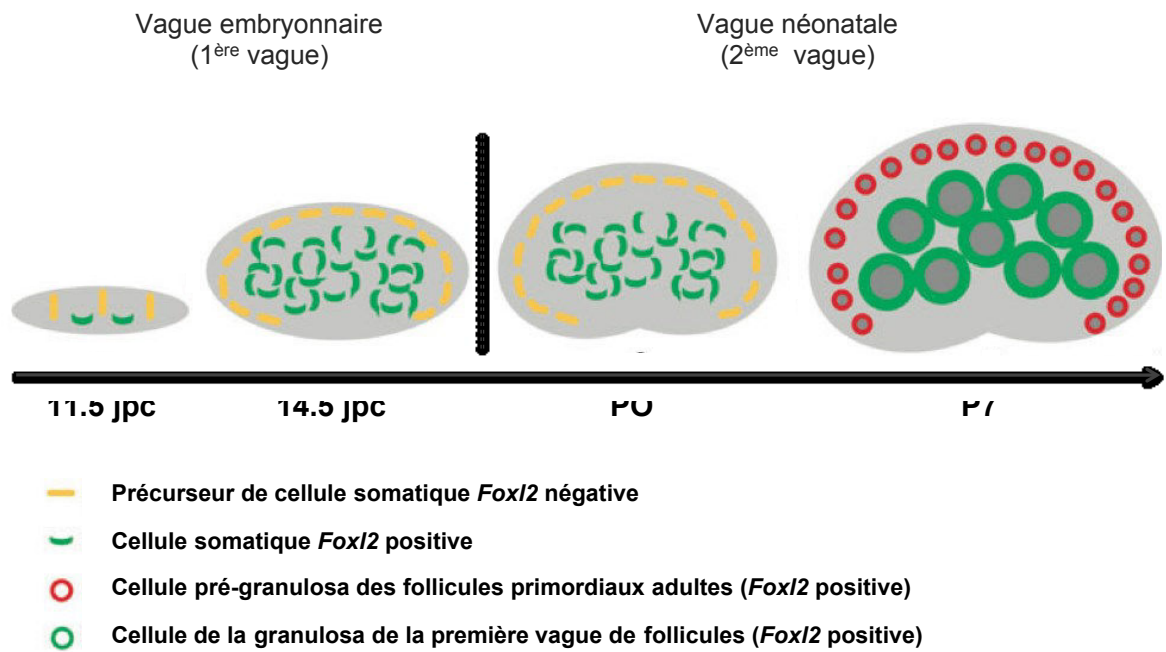


Figure 8: Deux classes de follicules primordiaux formés à partir de 2 vagues de cellules somatiques *Foxl2* positives.

Durant la vague embryonnaire, les cellules précurseurs des cellules somatiques, qui sont à ce stade *Foxl2* négatives, migrent de l'épithélium de la gonade à la région médullaire. Elles se différencient ensuite en cellules somatiques qui expriment *Foxl2* (pré-granulosa) à partir de 11.5 jpc et enfin en cellules de la granulosa de la première vague folliculaire après la naissance. La migration de ces cellules à l'intérieur de l'ovaire dure jusqu'à environ 14.5 jpc. Pendant ce temps, le 2ème groupe de cellules précurseurs des cellules de la granulosa, qui sont *Foxl2* négatives à ce stade, continuent de proliférer dans le cortex ovarien jusqu'à la naissance. L'expression de *Foxl2* est alors augmentée dans ces cellules après la formation des follicules primordiaux adultes, et constituent la vague néonatale de cellules *Foxl2* positives (Zheng et al., 2014).

2. Maturation folliculaire

2.1 Formation des follicules primordiaux

Après la différenciation des cellules germinales primordiales, les ovogonies prolifèrent avec une cytocinèse incomplète. Ceci laisse les cellules filles connectées entre elles par des ponts intercellulaires. Les cellules germinales rentrent ensuite en méiose pour donner les ovocytes. A ce stade les ovocytes sont indépendants des cellules somatiques et la majorité d'entre eux va entrer en apoptose au moment de la rupture de ce groupe d'ovocytes (Pepling & Spradling, 2001). La première étape de la folliculogénèse consiste en la formation des follicules primordiaux par dépôt des cellules squameuses pré-granulosa sur les ovocytes qui ont survécu à la rupture des kystes de cellules germinales.

Parmi les voies apoptotiques importantes impliquées dans la réduction du nombre d'ovogonies, on retrouve les membres de la famille de protéines BCL (B Cell Lymphoma/leukemia), qui ont des fonctions opposées dans ce processus (Matzuk, 2001). BCL2 et BCLX sont anti-apoptotiques alors que BAX promeut l'apoptose des cellules germinales (Perez et al., 1999; Rucker et al., 2000). Une deuxième voie apoptotique impliquée dans ce processus est la voie des Caspases (Joshi et al., 2007). Ce sont des protéases responsables du clivage d'un grand nombre de protéines au sein de la cellule, ce qui conduit à l'apoptose. L'étude de ces voies a permis de démontrer que l'apoptose est importante pour établir le stock de follicules primordiaux. Il a également été montré que l'apoptose joue un rôle important tout au long de la folliculogénèse pour l'atrésie folliculaire.

FIGL α (Factor In the GermLine α) est un facteur de transcription de la famille des bHLH, spécifique des cellules germinales, qui est nécessaire pour la formation initiale des follicules. Les souris invalidées pour le gène *Figl α* sont stériles suite à une absence totale de follicules et d'ovocytes (Soyal et al., 2000). Plus précisément, alors qu'à 18 *jpc* les souris mutantes ont le même nombre de cellules germinales que les souris contrôles, les follicules primordiaux ne se forment pas dans la période périnatale et il n'y a plus d'ovocytes à partir de P2.

2.2 Recrutement des follicules primordiaux

Le recrutement folliculaire est généralement divisé en 2 catégories : l'activation initiale des follicules primordiaux, qui a lieu tout au long de la vie jusqu'à la ménopause et, après la puberté, le recrutement cyclique d'un nombre limité de petits follicules parmi le groupe de follicules en croissance (McGee & Hsueh, 2000). Des modèles murins ont permis de définir plusieurs facteurs de transcription et voies de signalisation qui régulent cette étape de la folliculogénèse. La transition de follicule primordial au follicule primaire est marquée par un changement morphologique des cellules de la granulosa entourant le follicule, qui deviennent cuboïdales. *Foxl2* est un facteur important de cette étape puisque les souris invalidées pour ce gène présentent une anomalie de la différenciation des cellules de la granulosa. Chez ses mutants homozygotes, aucun follicule primaire, ni aucun autre stade folliculaire plus avancé n'a pu être observé (Schmidt et al., 2004). Un autre gène important à cette transition de follicule primordial à follicule primaire est le gène NOBOX (*Newborn oogenesis homeobox*). Les souris femelles *Nobox*^{-/-} sont stériles (Rajkovic et al., 2004). Une étude récente a montré que NOBOX est un partenaire clé de FOXL2 durant la folliculogénèse (Bouilly et al., 2014).

L'étude de Zheng et al., 2014 a démontré que la première vague de follicules constitue le stock de follicules croissants de P23 à P35 et que tous les follicules antraux à ce stade proviennent de cette même vague. Cette première vague de follicules primordiaux est caractérisée par un temps très court de maturation des follicules, comparé aux follicules primordiaux adultes (2^{ème} vague) (Zheng et al., 2014), et une production aberrante d'enzymes stéroïdogènes. Ceci mène à une baisse de la production d'oestradiol (Galas et al., 2012). Une étude de transplantation d'ovaires adultes et néonataux sur des rates adultes ovariectomisées a permis de démontrer que la première vague de follicules facilite la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophysaire au début de la période de reproduction. Le rôle des follicules primordiaux adultes est de fournir le stock folliculaire responsable du maintien de cet axe durant la vie adulte.

La communication entre les follicules est importante pour le destin des follicules en croissance. Plus précisément, il a été montré que les follicules en croissance peuvent bloquer le développement des follicules voisins (Baker & Spears,

1999). AMH est exprimé dans les cellules de la granulosa des follicules pré-antraux et des follicules à petit *antrum* (Durlinger et al., 2002). L'activation des follicules primordiaux, ainsi que la croissance des follicules peut être arrêtée par l'AMH (Durlinger et al., 2002; Nilsson et al., 2007). Un rôle potentiel de la première vague de folliculogénèse serait donc de générer une cohorte de follicules en croissance, exprimant AMH afin de bloquer le développement des follicules primordiaux adultes.

Enfin, plusieurs d'études ont suggéré que la première vague de follicules entre en atresie et dégénère rapidement (Eppig & Handel, 2012). Cependant les follicules de cette première vague sont capables de se développer *in vitro* et de donner naissance à des individus chez la souris et le rat après réimplantation (Popova et al., 2002). De plus, il a été récemment montré que la première vague de follicules persiste jusqu'à 3 mois après la naissance et ces follicules sont les follicules ovulatoires dominants pendant cette période (Zheng et al., 2014). La première vague de follicules semble donc avoir également un rôle important pour la fertilité des jeunes adultes.

2.3 Folliculogénèse pré-antrale

Elle est caractérisée par le développement de l'ovocyte, la prolifération des cellules de la granulosa et l'acquisition d'une couche cellulaire somatique supplémentaire, la thèque. Chez la souris, le développement de follicules pré-antraux commence 10 à 12 jours après la naissance quand un groupe de follicules en développement passe au stade de follicules secondaires. Les follicules secondaires contiennent des ovocytes au stade intermédiaire de leur développement qui sont entourés par une ou deux couches de cellules de la granulosa. Le développement de ces follicules est dépendant de facteurs autocrines et paracrines mais est indépendant des gonadotropines (Abel et al., 2000; Kumar et al., 1997). Pendant cette étape de la folliculogénèse, la communication entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent devient plus évidente. Même si l'ovocyte a besoin des cellules somatiques pour son développement, le rythme de croissance du follicule dépend beaucoup de l'ovocyte qui secrète plusieurs facteurs nécessaires à la maturation folliculaire, tels que les membres de la famille du TGF- β (transforming

growth factor β), GDF9 (growth différenciation factor 9), BMP6 (bone morphogenetic protein 6) et BMP15 (Emori & Sugiura, 2014).

2.4 Formation de la thèque

Une fois que le follicule atteint le stade de 2 couches de cellules de la granulosa, un nouveau changement morphologique a lieu. La thèque se met en place autour du follicule (Hirshfield, 1991). Les cellules de la thèque interne, qui se forme autour de la membrane basale qui entoure les cellules de la granulosa, sont responsables de la production d'androgènes pour les cellules de la granulosa (Magoffin, 2005). La thèque externe se compose de fibroblastes, de cellules similaires à des cellules de muscle lisse et des macrophages et elle est importante pour l'ovulation. Les cellules qui se différencient en cellules de la thèque proviennent de précurseurs mésenchymateux qui sont déjà présents dans le stroma ovarien (Hirshfield AN, 1991). Comme la folliculogénèse pré-antrale, la formation de la thèque est indépendante des gonadotropines (Kumar et al., 1997). Après la formation de la thèque interne, la LH contrôle la production des androgènes par les cellules de la thèque.

2.5 Formation des follicules antraux

Lors de la formation de l'antrum, des changements importants surviennent dans le follicule. La cavité antrale se forme quand plusieurs espaces remplis de liquide coalescent et séparent deux populations distinctes de cellules de la granulosa. L'une d'entre elles est la population de cellules de la granulosa dites murales, qui est importante pour la stéroïdogénèse et l'ovulation. Les cellules de la granulosa du *cumulus* entourent l'ovocyte, favorisant sa croissance et son potentiel de développement. Ces deux populations différentes sont définies par des gradients opposés, la FSH qui provient de l'hypophyse et les facteurs sécrétés par l'ovocyte provenant de l'intérieur du follicule (Diaz et al., 2007)(Edson et al., 2009). Le passage du follicule pré-antral au follicule antral marque la transition entre la régulation

intra-ovarienne de la folliculogénèse à une régulation extra-ovarienne puisque l'axe hypothalamo-hypophyse-gonades commence à fonctionner. Les hormones FSH et LH sont donc indispensables à cette étape de la folliculogénèse. Elles sont les gonadotropines hypophysaires qui coordonnent le développement des follicules antraux et l'ovulation. Ces glycoprotéines hétérodimériques ont une sous-unité β unique et une unité α commune. Plusieurs boucles de régulation positives et négatives dans l'axe hypothalamo-hypophyse-gonades coordonnent la maturation folliculaire et la sélection du follicule dominant ainsi que le comportement sexuel et la préparation à la grossesse. Même si les follicules pré-antraux sont déjà capables de répondre à la FSH, au stade antral la FSH devient essentielle (Kumar et al., 1997), non seulement pour prévenir l'apoptose des cellules de la granulosa et l'atrésie folliculaire (Chun et al., 1996), mais aussi pour la prolifération des cellules de la granulosa, la production d'oestradiol et l'expression du récepteur de la LH (Richards, 1994).

L'ovaire produit lui aussi des facteurs de croissance, dont des activines, des inhibines et la follistatine (FST), qui modulent la sécrétion de FSH (Bernard et al., 2001).

2.6 Le follicule pré-ovulatoire, l'expansion du *cumulus*, l'ovulation et la lutéinisation

La plupart des follicules en croissance vont entrer en atrésie avant d'arriver au stade de follicule antral. Les follicules antraux seront sélectionnés pour leur capacité à répondre à la FSH parmi une cohorte qui arrivera au stade pré-ovulatoire. Puis ces follicules induisent un signal rétroactif sur l'hypophyse par sécrétion d'oestradiol et d'inhibine. Le niveau de FSH baisse dans le sérum. L'augmentation de la production d'oestradiol par les follicules conduit à une augmentation de la production de LH, qui a pour résultat le pic de LH. Les follicules capables de répondre à ce pic sont ceux qui seront amenés à ovuler pour ensuite se différencier en corps jaune (Lei et al., 2001; Ma et al., 2004; Zhang, Poutanen et al., 2001).

2.7 Le corps jaune (*corpus luteum*)

Le corps jaune est une structure endocrine temporaire qui joue un rôle important pour le maintien de la grossesse. La formation du corps jaune à partir des cellules qui restent dans le follicule après l'expulsion de l'ovocyte, est déclenchée par l'ovulation. Ce processus, nommé également lutéinisation, est de nature inflammatoire et il est caractérisé par une perméabilité accrue des vaisseaux sanguins, la formation de nouveaux capillaires et le recrutement de leucocytes (G. W. Smith & Meidan, 2014). Au niveau cellulaire, le corps jaune se forme quand les cellules folliculaires sortent du cycle cellulaire et se différencient en cellules de la granulosa produisant de la progestérone (Moons DS et al., 2002). Ce pic de production de progestérone est important pour le maintien de la grossesse à ses stades précoces.

3. L'épithélium de surface ovarien

L'épithélium de surface ovarien (ESO) dérive du mésothélium pelvien et recouvre l'ensemble de l'ovaire. Au stade embryonnaire, l'ESO provient de l'épithélium cœlomique qui provient à son tour du mésoderme. Pendant et juste avant l'arrivée des cellules germinales primordiales dans la crête génitale, les cellules de l'épithélium cœlomique prolifèrent et certaines d'entre elles pénètrent dans le stroma ovarien. La croissance de ces cellules dans le cortex ovarien va donner naissance par la suite aux follicules ovariens comme décrit dans le chapitre de la folliculogénèse. Plus tard durant le développement embryonnaire, l'épithélium cœlomique de la surface latérale de la crête urogénitale prolifère et forme plusieurs invaginations, qui coalescent afin de former les canaux de Muller. Les canaux de Muller à leur tour donnent naissance à l'épithélium du système génital supérieur (Barber NRK, 1988). L'épithélium cœlomique embryonnaire peut donc se différencier de plusieurs façons différentes. L'ESO adulte garde le caractère non-engagé, pluripotent de son précurseur embryonnaire, l'épithélium cœlomique.

Il a un rôle important dans la physiologie ovarienne normale. Il participe à chaque cycle ovulatoire avec ses ruptures et réparations. Il a été démontré que l'ESO

autour du site d'ovulation est exposé à des cytokines inflammatoires et d'autres facteurs produits au moment de la rupture du follicule, qui ont pour résultat d'augmenter la probabilité de dommages sur l'ADN (Murdoch & Martinchick, 2004). L'activité mitogénique des cellules de l'ESO dans le processus de réparation de ce dernier pourrait donc favoriser la survie de cellules épithéliales ayant accumulé des mutations qui peuvent conduire à la transformation de ces cellules et finalement à des tumeurs ovariennes. Comme l'ovaire est une source riche d'hormones, de facteurs de croissance et de cytokines, qui s'y trouvent souvent à des concentrations plus élevées que les concentrations sériques normales, tous ces facteurs sont des candidats potentiels de la régulation de l'ESO (Lindgren et al., 2002).

4. Cancers ovariens

En France, le cancer de l'ovaire concerne environ 4400 personnes par an. C'est le 7^{ème} cancer le plus fréquent chez la femme et il comprend un panel vaste de différents phénotypes. Si les événements qui conduisent au développement tumoral, les lignées cellulaires impliquées, ainsi que les gènes responsables de l'apparition et de la progression des cellules tumorales ne sont pas totalement identifiés à ce jour, il est d'un commun accord que les cancers ovariens sont une maladie complexe qui dérive de 3 types cellulaires qui permettent de classer les cancers ovariens en trois groupes : Les tumeurs épithéliales, les tumeurs du stroma et des cordons sexuels ainsi que les tumeurs germinales (Mullany & Richards, 2012). De plus des données récentes suggèrent que certaines tumeurs épithéliales agressives ont une origine extra-ovarienne (Auersperg, 2011; J. Kim et al., 2012). On compte donc trois classes de cancers ovariens :

4.1 Tumeurs épithéliales

Les tumeurs épithéliales, appelées aussi carcinomes, sont les tumeurs gynécologiques les plus létales. Il est estimé qu'elles sont responsables de plus de 140.000 décès par an dans le monde (Jemal et al., 2011).

A l'heure actuelle il est considéré que la plupart des carcinomes ovariens sont originaires de l'ESO, de kystes d'inclusion post-ovulatoires formés après la rupture et la réparation de la surface ovarienne et des trompes de Fallope (Mok et al., 2007). Des facteurs considérés comme réduisant le risque de développer un cancer ovarien sont entre autres la grossesse, l'utilisation de contraceptifs oraux et l'allaitement (Tortolero-Luna & Mitchell, 1995). Tous ces facteurs sont associés à un nombre réduit d'ovulation et il est considéré que l'augmentation du nombre d'ovulation durant la vie joue un rôle important dans l'apparition de cancers ovariens (Ricciardelli & Oehler, 2009). Selon l'hypothèse de l'ovulation incessante, chaque ovulation crée une blessure au niveau de l'ESO. Les cellules de ce dernier prolifèrent suite à la rupture afin de réparer l'ESO au site d'ovulation (Tortolero-Luna & Mitchell, 1995). Cependant, cette hypothèse est contradictoire avec le fait que des patientes présentant le syndrome d'ovaires polykystiques, ayant donc un nombre réduit de cycles ovulatoire, ont un risque accru de développer une tumeur ovarienne (Schildkraut et al., 1996). Le risque important de tumeurs ovariennes après l'utilisation de médicaments indiqués en cas d'infertilité soutient le fait que la stimulation de l'ESO avec des gonadotropines augmente le risque de développement tumoral (Mok et al., 2007). Cette hypothèse est également appuyée par le fait que l'incidence de cancers ovariens augmente après la ménopause, durant laquelle le niveau de gonadotropines augmente (Mandai et al., 2007).

Les carcinomes sont classés en fonction des différents épithéliums du tractus génital femelle. Ils sont divisés en carcinomes sériques, muqueux, endométrioïdes, "clear cell" et "transitional cell". Il était considéré jusqu'à récemment que ces carcinomes proviennent de l'ESO et que des métaplasies conduisent par la suite au développement des différents types cellulaires énumérés si dessus. Cependant, des études histopathologiques, moléculaires et génétiques récentes ont permis d'établir un nouveau modèle pour la carcinogenèse ovarienne. Plus précisément, il y aurait deux catégories, désignées comme type I quand des lésions pré-tumorales ont été décrites au sein de l'ovaire, et type II quand de telles lésions n'ont pas été identifiées et la tumeur pourrait être apparue *de novo* à partir de l'ESO (Landen C.N et al., 2008).

Les tumeurs de type I ont un comportement indolent et semblent faire partie au départ d'un ensemble morphologique et moléculaire tels que des adénofibromes bénins qui se développent ensuite vers des formes de tumeurs plus prolifératives

pour enfin devenir invasives. Ces tumeurs sont souvent limitées à l'ovaire au moment du diagnostic avec un génome stable et sans mutations de *p53*. Des mutations somatiques sont cependant fréquemment détectées (Kurman & Shih, 2008).

Les tumeurs de type II sont plus agressives, sont diagnostiquées à des stades plus avancés et ont un profil génétique très instable. La plupart d'entre elles présentent des mutations de *p53* et beaucoup d'entre elles ont des mutations également de gènes impliqués dans les cancers mammaires, tels que BRCA 1 et 2 (George & Shaw, 2014; Santin et al., 2005). Il est considéré à ce jour que ces tumeurs peuvent se développer à partir de l'épithélium des trompes de Fallope et/ou l'ESO (Przybycin et al., 2010).

4.2 Tumeurs du stroma et des cellules de la granulosa

Ces tumeurs comprennent 7% des cancers ovariens. La sécrétion d'hormones est caractéristique de ces tumeurs qui se présentent souvent comme une masse unilatérale importante. 70% des tumeurs de cette catégorie sont des tumeurs des cellules de la granulosa, qui sont classées à 95% adultes et 5% juvéniles (Colombo et al., 2007). Ces tumeurs sont caractérisées par une croissance relativement lente et sont assez rares du fait que les follicules atresiques soient éliminés de façon très efficace. Ces tumeurs sont les tumeurs spontanées les plus communes chez la souris (Beamer et al., 1985). Il est important de noter qu'il y a à ce jour des preuves que chez certaines espèces, comme la souris, un nombre important de cellules de la granulosa proviennent de l'ESO durant la vie péri-natale (Mork et al., 2012 ; Zheng et al., 2014). Il reste cependant inconnu si ces cellules, dérivées de l'ESO participent au développement tumoral. Des études menées sur des modèles animaux différents peuvent mener à l'hypothèse que les cellules de la granulosa dérivées des cellules épithéliales de l'ESO, maintiennent une certaine plasticité et dans certains cas peuvent se développer de façon incontrôlée en l'absence d'ovocyte, important régulateur de la croissance folliculaire (Braw-Tal et al., 1993; Houghtaling et al., 2003).

4.3 Tumeurs des cellules germinales

Ces tumeurs représentent 20-25% des néoplasmes ovariens mais seulement 1-2% des cancers ovariens (Pectasides et al., 2008). Elles représentent cependant la majorité des tumeurs ovariennes chez les femmes de moins de 20 ans. Contrairement aux tumeurs épithéliales, ces tumeurs sont diagnostiquées le plus souvent au stade I, parce qu'elles se développent rapidement (H. O. Smith et al., 2006). Elles comportent plusieurs catégories, la plus fréquente étant les tératomes, qui se divisent eux mêmes en tératomes matures (bénins), immatures (malins) et monodermaux. Les tératomes cystiques matures présentent un grand intérêt parce qu'ils contiennent des tissus adultes provenant des trois couches germinales, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. De même que les tératomes immatures avec la différence que ces différents tissus sont plus proches des tissus embryonnaires (Crum CP, 1999). Dans la plupart des cas, ces tumeurs se forment à partir d'embryons qui commencent à se développer en absence de fécondation (Stevens & Varnum, 1974).

5. La voie WNT dans l'ovaire adulte

L'importance de la voie WNT dans le développement de l'ovaire embryonnaire est à ce jour établie puisque l'étude de modèles murins de perte de fonction de *Wnt4* a montré une absence totale d'ovocytes dans l'ovaire de ces souris (Vainio et al., 1999). Une autre étude a démontré que *Wnt7a* est également impliqué dans la différenciation du tractus génital femelle (Parr & McMahon, 1998).

En 2002, Ricken et al. ont démontré que des acteurs de la voie de signalisation WNT sont exprimés dans les ovaires de rates immatures et que leur expression était spécifique de différents types cellulaires ovariens (Ricken et al., 2002). Plus précisément, ils ont observé que *Wnt2* et *Fzd4* sont exprimés dans les cellules de la granulosa, alors que *Wnt2b* est exprimé dans les cellules de l'OSE.

L'étude des souris invalidées pour *Wnt2* n'a cependant pas pu montrer de problème de fertilité suggérant une éventuelle redondance avec un autre *Wnt* (Monkley et al., 1996). Les souris invalidées pour *Fzd4*, présentent un

développement folliculaire normal mais ont des problèmes de fertilité du à un défaut d'implantation. Les corps jaunes de ces souris ne se développent pas normalement, ce qui explique le défaut d'implantation observé (Hsieh et al., 2005).

Il a également été montré très récemment que *Wnt4* est non seulement important pour la différenciation ovarienne au stade embryonnaire, mais aurait également un rôle dans l'ovaire adulte (Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2014). En croisant des souris ayant le gène *Wnt4* floxé avec 2 lignées murines différentes (*Amhr2Cre* et doxycycline-inducible *Rosa(rtTA)-knock-in Cre*) les auteurs ont pu observé que la folliculogénèse chez ces femelles est compromise. Ces souris sont donc sévèrement hypofertiles. Ces défauts ont été associés dans la même étude avec des anomalies de la polarité cellulaire au sein des follicules. La laminine et le collagène IV ont assemblé des structures de membrane basale ectopiques, les composants des jonctions adhérentes ont perdu leur patron d'expression polarisé et l'expression de la connexin 43 est réduite de 30%. De plus, l'expression de l'*Amh* est inhibée en absence de *Wnt4* (Prunskaitė-Hyyryläinen R et al., 2014). Il est donc clair que la signalisation induite par *Wnt4* est nécessaire à la maturation folliculaire, l'expression de l'*Amh* et l'organisation polarisée des cellules folliculaires.

Enfin, l'étude d'un modèle murin de stabilisation de β catenin dans l'ovaire a montré que ces souris développent des structures anormales ressemblant à des follicules mais dans lesquels il n'y a pas d'ovocytes et que ces structures dégénèrent en cancers (Boerboom et al., 2005). Cette étude a permis de démontrer le rôle important de *β catenin* dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules de la granulosa.

Mis à part la fonction de la voie WNT dans l'ovaire normal, un lien entre cette voie et les tumeurs ovarienne a également été établi puisque des mutations de *β catenin* ont été découvertes dans des cas de cancers ovariens (Saegusa & Okayasu, 2001). Le plus souvent, la dérégulation de la voie est due à une mutation du gène de *β catenin*, mais des mutations inactivatrices de APC, AXIN1 et AXIN2 ont également été observées (Wu et al., 2001).

-OBJECTIFS-

Objectifs de la thèse

Rspo1 et *Sox9* sont connus comme étant des facteurs clés de la détermination du sexe femelle et mâle respectivement. Comme décrit dans l'introduction, les mutations de ces gènes peuvent induire des inversions de sexe chez l'humain et la souris (Parma et al., 2006 ; Chassot et al., 2008 ; Houston et al., 1983 ; Chaboissier et al., 2004). Mon travail de thèse se divise en deux parties distinctes : a) L'étude du rôle de *Sox9* et *R-spondin1* dans les pathologies d'inversion de sexe chez la souris et b) L'étude du rôle de *R-spondin1* dans l'homéostasie de l'ovaire adulte chez la souris.

a) Un des gènes clefs de la détermination ovarienne, *R-spondin1*, a été découvert chez une famille de patients atteints d'hyperkératose palmoplantaire. Son invalidation chez la souris conduit à une inversion de sexe chez les individus XX qui apparaît autour de la naissance (Parma et al., 2006). L'apparition des cordons testiculaires est concomitante avec l'expression de *Sox9* ce qui suggère que *Sox9* est le facteur responsable de la différenciation testiculaire dans les gonades XX *Rspo1*^{-/-}. Pour tester cette hypothèse, nous avons besoin dans un premier temps d'un modèle viable d'invalidation conditionnelle du gène *Sox9* dans la gonade *Sox9*^{flox/flox} ; *Sf1* :*cre*^{Tr/+}. Tous les modèles précédemment utilisés présentent un fort taux de mortalité, qui empêche de construire des modèles murins composites (Chaboissier et al., 2004 ; Barrinuevo et al., 2006). Pour la réalisation de la suite de cette étude, la génération d'un modèle viable et permettant une invalidation efficace du gène *Sox9* dans les gonades est indispensable.

Dans un second temps nous allons mettre en place un modèle de double invalidation des gènes *R-spondin1* et *Sox9* pour tester si *Sox9* est responsable de l'inversion de sexe chez les souris XX *Rspo1*^{-/-}. Si *Sox9* est nécessaire à l'inversion de sexe, nous nous attendons à ce qu'aucun cordon testiculaire ne se forme en absence de *Sox9*. Il est possible que les gonades XX *Rspo1*^{-/-} ; *Sox9*^{flox/flox} ; *Sf1* :*cre*^{Tr/+} restent indifférenciées ou qu'elles se développent en ovaires. Cette partie de l'étude nous montrera si *Sox9* est bien le facteur qui induit la différenciation testiculaire dans les gonades des souris XX *Rspo1*^{-/-}.

b) Le rôle de *R-spondin1* dans la détermination ovarienne est déjà bien établi. Cependant le rôle de ce gène dans la physiologie de l'ovaire adulte reste à étudier. Une analyse fonctionnelle par mutation de perte-de-fonction et gain-de-fonction permettra de définir le rôle de *R-spondin1* dans l'ovaire après la naissance. Le modèle murin d'inactivation complète de *R-spondin1*, généré au laboratoire conduit à une inversion de sexe chez la plupart des individus (Chassot et al., 2008). Pour analyser le rôle de *R-spondin1* dans les gonades XX *Rspo1*^{-/-} après la naissance, il faut obtenir des gonades qui ne présentent pas ou peu d'inversion de sexe. Il a été montré que la pénétration du phénotype d'inversion sexuelle dépend du fond génétique utilisé (Munger et al., 2009). Nous rechercherons un fond génétique qui favorise le développement ovarien dans les gonades XX *Rspo1*^{-/-}. Nous commencerons notre étude en caractérisant le phénotype des individus XX *Rspo1*^{-/-} de différents fonds génétiques. Le fond génétique 129SV favorise la masculinisation contrairement au fond génétique C57Bl6. Cependant, *R-spondin1* est nécessaire au développement de la glande mammaire (Chadi et al., 2009). L'ablation d'une copie de ce gène sur fond génétique C57Bl6 affecte sévèrement le développement de la glande mammaire, l'allaitement des souriceaux et leur survie. De ce fait, ce fond génétique ne peut être utilisé dans notre analyse.

Dans un second temps nous étudierons un modèle d'expression constitutive de *R-spondin1* dans l'ovaire. Il a été montré que le niveau d'expression de *R-spondin1* diminue drastiquement à l'âge adulte (Auguste et al., 2011)(Uhlenhaut et al., 2009). Ainsi l'analyse de ce modèle nous permettra de comprendre le rôle de *R-spondin1* dans le développement de l'ovaire après la détermination du sexe et éventuellement dans l'apparition de pathologies ovariennes. Cette hypothèse est appuyée par l'étude de Boerboom et al., (2008) dans laquelle l'activation constitutive de β catenin dans l'ovaire induit l'apparition de structures folliculaires anormales qui dégénèrent en tumeurs des cellules de la granulosa.

-RESULTATS-

ARTICLE 1

—

« XY Sox9 embryonic loss-of-function mouse mutants show complete sex reversal and produce partially fertile XY oocytes »

Developmental Biology
(2011)

A. *Sox9/R-spondin1* et l'inversion de sexe

1. Article 1- Les souris XY invalidées pour le gène *Sox9* au stade embryonnaire présentent une inversion de sexe complète et donnent des femelles partiellement fertiles

Résumé

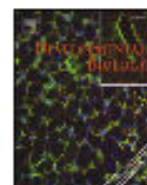
Chez les mammifères, la différenciation de la gonade est la première étape de la détermination du sexe. L'expression de *Sry*, situé sur le chromosome Y, conduit à l'expression du facteur de transcription *Sox9*, promouvant par la suite la différenciation testiculaire. Il a déjà été montré qu'en absence de *Sox9* les gonades foetales XY expriment des marqueurs ovariens. Afin d'identifier les réseaux génétiques impliqués dans l'inversion de sexe, nous avons réalisé une étude globale du transcriptome de gonades mutantes et contrôles de souris à 13,5 *jpc*. Nous avons utilisé des gonades d'individus XY *Sf1:Cre(TG/+); Sox9(flox/flox)* dans lesquelles *Sox9* est délété dans les précurseurs des cellules de Sertoli, des ovaires XX *Sox9(flox/flox)* et des testicules XY *Sox9(flox/flox)* comme contrôles à 11,5 *jpc*. Nous avons observé un profil transcriptionnel intermédiaire entre celui des gonades mâles et femelles. Cependant, les gonades XY *Sf1:Cre(TG/+); Sox9(flox/flox)* se développent en tant qu'ovaires XY contenant des follicules à P0. Par quantification, nous avons montré que les follicules sont moins nombreux chez les femelles XY mutantes par rapport à des femelles contrôles. De plus, ces femelles XY présentent une fertilité réduite de 2/3 par rapport à leurs sœurs contrôles. En effet, la majorité de ces ovocytes ne se développent pas au delà du stade deux cellules. En résumé, nous avons montré que les femelles XY *Sf1:Cre(Tg/+); Sox9(flox/flox)* sont capables de produire des descendants, bien qu'en nombre réduit en comparaison avec la descendance de femelles contrôles.



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/developmentalbiology



XY *Sox9* embryonic loss-of-function mouse mutants show complete sex reversal and produce partially fertile XY oocytes

Rowena Lavery^{a,b}, Aurélie Lardinois^c, Fariba Ranc-Jianmotamedi^{a,b,1}, Eva Pauper^{a,b,1}, Elodie P. Gregoire^{a,b}, Caroline Vigier^{a,b}, Chimene Moreilhon^{d,e}, Michael Primig^c, Marie-Christine Chaboisier^{a,b,*}

^a INSERM U636, F-06100 Nice, France

^b Université de Nice-Sophia Antipolis, Laboratoire de Génétique du Développement Neural et Pathologique, F-06100 Nice, France

^c INSERM U636M U625, University of Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042, Rennes, France

^d CNRS, Institut de Neurosciences Moléculaires et Cellulaires, UMR6087, F-06100, Sophia Antipolis, France

^e CHU de Nice, Service Gynécobinéarologie, Hôpital Pasteur, Nice, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received for publication 30 June 2010

Revised 18 March 2011

Accepted 26 March 2011

Available online 3 April 2011

Keywords:

Sex determination

Sox9

Mouse model

Sex reversal

XY oocytes

ABSTRACT

Gonadal differentiation is the first step of mammalian sex determination. The expression of the Y chromosomal testis determining factor *Sry* leads to up-regulation of the transcription factor *Sox9* which promotes testis differentiation. Previous studies showed that *Sox9* deficiency induces expression of ovarian markers in XY mutant fetal gonads before they die. To better understand the genome-wide transcriptional profile underlying this process we compared samples from XY *Sry:Cre*^{+/+}; *Sox9*^{fl/fl} mutant gonads in which *Sox9* is deleted in Sertoli-precursor cells during early stages of gonad development to XX *Sox9*^{fl/fl} ovaries and XY *Sox9*^{fl/fl} testes at E13.5. We found a complex mRNA signature that indicates wide-spread transcriptional de-regulation and revealed for XY mutants at E13.5 an intermediate transcript profile between male and female gonads. However, XY *Sry:Cre*^{+/+}; *Sox9*^{fl/fl} mutant gonads develop as ovaries containing XY developing follicles at P0 but less frequently so than in XX control ovaries. Furthermore, we studied the extent to which developing XY mutant ovaries are able to mediate adult fertility and observed that XY oocytes from XY mutant ovaries are competent for fertilization; however, two thirds of them fail to develop beyond two-cell stage embryos. Taken together, we found that XY *Sry:Cre*^{+/+}; *Sox9*^{fl/fl} females are capable of producing viable offspring albeit at a reduced level.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

In most mammalian species, sexual differentiation is determined by the paternal transmission of the *SRY* gene located on the Y chromosome (Gubbay et al., 1980; Sinclair et al., 1990). *SRY* expression promotes testis differentiation of the XY bipotential gonad whereas an XX gonad develops into an ovary. In mice, transgenic experiments have shown that *Sry* is necessary and sufficient for testis differentiation (Koopman et al., 1990; Lovell-Badge and Robertson, 1990) and the only function of *Sry* reported so far is to induce the transcription factor *Sox9* (Canning and Lovell-Badge, 2002; Qin and Bishop, 2005; Sekido and Lovell-Badge, 2008) for which we will employ the mouse nomenclature unless specified otherwise. *Sox9* is initially expressed at low levels in both XX and XY genital ridges prior to *Sry* expression in mouse and human embryos (Morais da Silva et al., 1996). Upon *SRY* expression, *Sox9* becomes strongly induced in pre-Sertoli cells and subsequently Sertoli nurse cells which are critical for XY gonad development (Sekido et al., 2004; Sekido and Lovell-Badge, 2008; Wilhelm et al., 2005). *Sox9* gain-

of-function experiments promote testis development of XX gonads (Bishop et al., 2000; Vidal et al., 2001) and one case of duplication of the *SOX9* gene has been shown to be associated with XX sex reversal in a patient (Huang et al., 1999). Thus the gene is sufficient for testis differentiation and male sex determination.

Heterozygous mutations of *SOX9* are associated with campomelic dysplasia (CD), a skeletal malformation syndrome (Houston et al., 1983). Two thirds of XY patients exhibit male-to-female sex reversal implying that sufficient levels of *SOX9* expression are required for testis differentiation and subsequent male development. In human and mice, the gene is required for various developmental processes such as chondrogenesis or neural development (Guth and Wegner, 2008). A null mutation of mouse *Sox9* is lethal during the neo-natal period due to respiratory failure which is a common condition described in CD patients (Bi et al., 2001). However, in contrast to what was observed in humans, heterozygous mutations of *Sox9* do not trigger XY sex reversal in mice.

The expression of CRE recombinase in germ cells (Chaboisier et al., 2004), in embryonic ectoderm, in embryonic mesoderm or in definitive endoderm (Harrimann et al., 2006) deletes *Sox9* from cells within the urogenital ridge. However, its expression in these other than gonads causes an embryonic lethal phenotype (Aiyama et al., 2004; Chaboisier et al., 2004) thereby preventing a thorough analysis

* Corresponding author. Fax: +35 492 87 64 02.

E-mail address: marie-christine.chaboisier@inserm.fr (M.-C. Chaboisier).

¹ These authors have equally contributed to the work.

of *Sos9* function during sex determination. This problem was circumvented by using either gonad cultures or the few surviving *Sos9* loss-of-function embryos to show that *Sos9* induces Sertoli cell differentiation which triggers testis formation (Barrionuevo et al., 2006; Chabobster et al., 2004). The mouse *Pg2/Pg12* and *Pg2/Pg3* signaling pathways also promote testicular development and maintenance of *Sos9* expression since *Sry* expression has ceased (Kim et al., 2006; Maniot et al., 2009). Indeed, *Sos9* ablation promotes the expression of ovarian markers in XY gonads implying male-to-female sex reversal of XY mutant gonads. However, their fertility was not assessed because the developing fetuses died early during development (Barrionuevo et al., 2006; Chabobster et al., 2004).

Sex-reversed *MOY*tm females bear a Ytm chromosome from the *Mus musculus domesticus* species captured in Tirano (TIR, Italy) in a C57BL/6J background. These females are infertile because of a defect in Meiosis II which is rescued by transfer of the karyoplast into an enucleated oocyte; this suggests that XY oocytes cannot undergo embryonic development (Ohta et al., 2008). Mouse mutants bearing a partial deletion allele of *Sry* can, however, produce offspring which in most cases exhibits chimerism due to non disjunction between sex chromosomes in meiosis (Gibbey et al., 1990; Lovell-Badge and Robertson, 1990). In human patients characterized by a 46, XY karyotype presenting with disordered sex development (DSD), gonadal dysgenesis ranges from streak gonads to ovaries and one female with high levels of sex chromosome chimerism has given birth (Mendonça et al., 2008). These cases of sex reversal are associated with the Y chromosome and thus with genes required and expressed during testis differentiation. In contrast, *Sos9* expression is not restricted to the XY gonads but has also been detected in steroidogenic cells of the preantral/antral follicles in mice suggesting a role for this gene in follicle maturation (Notarnicola et al., 2006).

To gain further insight into *Sos9* function during sex determination and early sexual development, we crossed mice bearing the *Sf1:Cre* transgene (Bingham et al., 2006) and the *Sos9*^{fl/fl} allele thereby removing exons 2 and 3 of the *Sos9* gene specifically in somatic cells of the developing gonad. We report male-to-female sex reversal at different stages as assessed by histology, histochemistry, and *in situ* hybridization and provide evidence via genome-wide expression profiling for gonads from XY *Sf1:Cre*^{+/+}; *Sos9*^{fl/fl} mutant mice at E13.5 to display an intermediate expression signature between ovaries and testes. Moreover, we find that XY follicles develop at P0 in XY mutant ovaries and XY mutant oocytes are fertilizable and are capable of mediating embryonic development. Taken together, our data suggest that, although XY follicle formation in XY mutant ovaries occurs at a reduced level, XY oocytes in XY *Sf1:Cre*^{+/+}; *Sos9*^{fl/fl} mice are at least partially able to be fertilized and to undergo embryonic development, and that *Sos9* is not essential for fertility in female mice.

Materials and methods

Mouse strains and genotyping of embryos and mice

The experiments here described were carried out in compliance with the relevant institutional and French animal welfare laws, guidelines and policies. All mouse lines were kept on a mixed 129/C57BL6/J background. The generation of *Sos9*^{fl/fl} allele (Akiyama et al., 2002) and the *Sf1:Cre* line (Bingham et al., 2006) were reported previously. The tail snip (Tn) number was determined by counting them from the middle of hind limb until the end of the tail. PCR was carried out using DNA extracted from tail tip of embryos. Wild-type and *Sos9*^{fl/fl} alleles were identified using the primers 5'-GGGGCTGTGTCCTCAGAG-3', or 5'-ACACAGCATAGCCAGCTG-3' and 5'-TGTATGAGTCAATACAGAGTAC-3', respectively. The *Sos9* knockout allele was identified using the primers: 5'-CTCAAGCCAGCCATG-3' and 5'-TGCTAATGAGTCAATACAGTAC-3'. Genotyping for the *Sf1:Cre* transgene was performed as described (Bingham et al., 2006). The presence of the *Sry* gene was determined

using primers 5' CTCACAATTGTCTAGAGAGC 3' and 5' ACTCGA-GAAGGTTGTACAGT 3'. *Pg26* primer set 5' GCMACAGGAGGAGGGG-GAGA 3'; 5' CTTTCTCAGAG-CCTCAATCTG 3' was included in each PCR reaction as an internal control.

Histological and immunological analyses

Embryonic samples from mated animals (day of vaginal plug = E0.5) were fixed with 4% paraformaldehyde (for immunostaining) or Bouin's solution (for histological analysis) over night at 4 °C and then embedded in paraffin. 8 μm or 5 μm sections were stained with Hematoxylin and Eosin Staining. Immunofluorescence analysis was performed after antigen retrieval in 10 mM Sodium citrate (pH 6) for 2 min in a pressure cooker. Sections were incubated for 45 min in blocking solution (3% BSA, 10% donkey serum, 0.1% Triton) at room temperature. The blocking solution was replaced by the primary antibodies diluted in 3% BSA, 3% donkey serum, 0.1% Triton at the following concentrations: SOX9 (provided by Michael Wegner, 1/1000), SID1G1 (provided by Ian Adams, 1/1000), FOXL2 (Abcam 1/300) and DDX4/MVH (Abcam 1/200) SPURD2 (Enzo Life Sciences, 1/100). Cy3- or FITC-conjugated anti-rabbit or anti-goat secondary antibodies were diluted at 1/150 (Jackson Laboratories). Slides were mounted using Vectashield and DAPI (Vector Labs). Fluorescent studies were performed with an AxioImager Z1 microscope (Zeiss), and pictures were taken with an AxioCam Z1 CCD camera (Zeiss).

Germ cell quantification

For each genotype four sections of three embryos each were processed for immunohistological experiments. The anti DDX4/MVH antibody was used to identify germ cells. The total number of germ cells was quantified within a defined area and for each genotype the mean and standard deviation was calculated and graphically displayed after statistical analysis. The results were analyzed using Graphpad.

Whole mount *in situ* hybridization analysis

Embryos were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4 °C. Further processing of the embryos and *in situ* hybridization was carried out as previously described (Chassot et al., 2008). Riboprobes for *Hyo1* (Parna et al., 2006), *Stro8* (Menke et al., 2003), *Sox2* (Furuta et al., 1997), *Sox2* (plasmid provided by Seppo Vainio), *Sox8* (Sock et al., 2001), *Sertol1* (Britsch et al., 2001), *Brh39* (Britsch et al., 2001), *Pg3* (provided by P. Koopman) and *Pg9* (Cebria et al., 2001) were synthesized as described previously. The *Pgf79* (NM_028716) probe was provided by D. Badra.

RNA preparation

Individual gonads without mesonephros dissected from E13.5 embryos were snap frozen at -80 °C and the RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen). The developmental stage and the phenotype of each embryo were recorded. Each RNA sample consisted of 12 gonads from six pooled mutants. Separate sets of mutant gonads and wild-type gonads were used for each of the microarray analyses.

RNA isolation and GeneChip hybridization

Three independent experiments were performed for XX and XY wild-type (*Sos9*^{fl/fl}) and XY *Sos9* mutant (*Sf1:Cre*^{+/+} *Sos9*^{fl/fl}) samples. RNA quality was assessed by measuring the optical density at 230 nm (*A*²³⁰), 260 nm (*A*²⁶⁰) and 280 nm (*A*²⁸⁰) using a ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE 19810, USA) as well as the electrophoretic mobility using the Agilent 2100 BioAnalyzer

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051, USA). All RNAs were found to have A^{260}/A^{280} ratios >1.97 , A^{260}/A^{230} ratios >1.15 , and RIN scores >8.9 (Schroeder et al., 2006). cDNA was generated using 300 ng of total RNA and the GeneChip WT cDNA Synthesis and Amplification Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA 95051, USA). cDNA was fragmented and end-labelled using the GeneChip WT Terminal Labelling Kit (Affymetrix) and hybridized to the Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array at 45 °C for 17 h. Hybridized arrays were washed and stained in a GeneChip Fluidics Station 450 and scanned with a GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) using default settings.

Expression data analysis

Data analysis was performed using the AMEN (Annotation, Mapping, Expression and Network analysis) suite of tools (Chakral and Prinig, 2008). Data from triplicate XY *Sox9* mutant, XY wild-type and XX wild-type samples and 11 control tissues (brain, embryo, heart, kidney, liver, lung, ovary, skeletal muscle, spleen, testicle and thymus) provided by Affymetrix were normalized using the Robust Multi-Array Average (RMA) method (Irizarry et al., 2003). Statistical filtration and classification was performed for the three following comparisons: XY_WT versus XY KO, XX_WT versus XY KO, and XX_WT versus XY WT (Supplemental Fig. 2a). Probe sets yielding signals ≥ 6.935 (median of the normalized dataset) and a fold change ≥ 2.0 were selected in each of the three comparisons. A limma statistical test (P-value adjusted with False Discovery Rate ≤ 0.05) was used to identify significantly differentially expressed probe sets which were subsequently classified into two groups using the k-means algorithm ($k = 2$).

NCBI e-utilities

Raw data CEL files are available at the NCBI's GEO certified public repository via the accession number GSE81650.

Gene ontology enrichments

The gene ontology (GO) over-representations were estimated with the Fisher exact probability, using the Gaussian Hypergeometric Test. A GO term was considered to be significantly enriched in a given group of genes when the p-value corrected with the FDR method was ≤ 0.01 and ≥ 3 genes within the group were associated with the annotation term.

Q-PCR analysis

Ovaries ($n = 6$) were collected from XX *Sf1:Cre^{+/+}; Sox9^{fl/fl}* or XX *Sox9^{fl/fl}* females at the age of four weeks, fat and oviducts were removed and samples were snap frozen in dry ice and stored at -80 °C. RNA was extracted using the RNeasy lysis mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany). cDNA synthesis was performed as previously described (Chassot et al., 2008). Primers and probes were designed by the Roche Assay design center (<https://www.rocheappliedscience.com/ah/rtpr/apl/wdc.jsp>): *Sox9* (NM_011448.4) 5'-CAGCAAGACTCTGGCAAG-3' and 5'-TCCAGGAGGCTCTCTCTC-3' (probe 68), *Mpr17* (NM_013556.2) 5'-TCCCTCTCAGACCGCTTTT-3' and 5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3' primers and probe set (probe 95) were used to normalize the Q-PCR assays for *Sox9*. Statistical analysis was performed using the Prism Graphpad software.

Superovulation and oocyte retrieval

Superovulation was induced in XY *Sf1:Cre^{+/+}; Sox9^{fl/fl}* females by intra peritoneal injection of 5 IU of eCG (Intervet UK Ltd., Cambridge, UK) followed by injection of 5 IU of hCG (Intervet) 44–48 h later. Females were mated with B6DBA males yielding a C57BL/6pDBA F1 background. One-cell stage embryos were recovered from

oviducts at E1 21–23 h after hCG injection. Two-cell stage embryos were isolated by flushing oviducts 32–34 h after hCG injection. Morulae were obtained by flushing both oviducts and uteri at E3 following hCG injection. M2 (Sigma) and KSOM medium (Specialty Media) were used in our studies. Culture dishes with embryo-containing microdrops were incubated under oil at 37 °C in an incubator equilibrated with 5% CO₂ atmosphere.

Immunostaining of oocytes and embryos

Oocytes and embryos were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS containing 1% BSA for 30 min and washed twice in fresh PBS. Fixed embryos were blocked and permeabilized in PBS with 0.25% Tween-20 and 0.1% BSA for 15 min and incubated at room temperature with a monoclonal mouse anti- β -Tubulin antibody (Sigma) at 1/100 followed by incubation with Alexa Fluor rabbit anti-mouse antibody (Invitrogen) at 1/500. Between each step the embryos were washed 3 times with PBS. Samples were mounted on glass slides with Vectashield mounting medium containing DAPI and examined on an AxioImager Z1 fluorescence microscope (Zeiss).

Results

Conditional inactivation of *Sox9* in XY gonads

Sox9 is required for various processes of organogenesis and previous mouse models lacking *Sox9* displayed an embryonic lethal phenotype due to expression of the CRE recombinase in tissues other than gonads (Marrionuevo et al., 2008; Chakroborty et al., 2004). This problem is avoided by expressing CRE recombinase using the *Sf1* promoter which is active in the pituitary, spleen, adrenal and gonad (Bhargava et al., 2006). To evaluate whether the *Sf1:Cre* transgene mediated *Sox9* loss-of-function in the XY gonads, we generated XY *Sf1:Cre^{+/+}; Sox9^{fl/fl}* embryos (referred to as XY mutants throughout the text) and analysed their phenotypes at E11.5 during the onset of *Sox9* expression and at E13.5 when *Sox9* expression is strongly induced. The number of embryos recovered ($n = 8$) was normal in comparison to XX control females implying that ablation of *Sox9* in the cells expressing *Sf1:Cre* has no deleterious effect on the development of *Sf1:Cre^{+/+}; Sox9^{fl/fl}* embryos. At E11.5, whole mount *in situ* hybridizations with a *Sox9* probe showed its expression in the urogenital ridges of XY control embryos while XX gonads yielded no signal (Fig. 1). At this stage, *Sox9* expression was weak or absent in XY mutant urogenital ridges indicating that *Sox9* was deleted in the transgenic gonads. Next, immunostaining of E11.5 gonadal sections with SOX9 antibody clearly detected SOX9 in XY gonads, but not in XX gonads and in only a few gonadal cells in XY mutant embryos. In contrast, SPRED2 was expressed at higher levels in XX or XY mutant urogenital ridges than in XY gonads (Fig. 1). By E13.5, neither *Sox9* nor AMH were detected in XY mutant or XX gonads while it was strongly expressed in XY gonads. We conclude that *Sox9* was successfully deleted in XY mutant gonads at this stage (Fig. 1). We then examined the expression of FOXL2, a marker of pre-follicular cells. The protein was detected in XX and XY mutant but not XY wild-type samples (Fig. 1). Taken together, these results are consistent with the idea that *Sox9* loss-of-function in XY gonads promotes ovarian development.

XY *Sf1:Cre^{+/+}; Sox9^{fl/fl}* mutant gonads display an intermediate expression signature as compared to XY *Sox9^{fl/fl}* and XX *Sox9^{fl/fl}* wild-type controls

To investigate the genome-wide transcriptional signature in XY mutant mice versus XX and XY wild-type controls we performed an expression profiling analysis of E13.5 gonads using mouse GeneChips (Materials and Methods). The mRNA profiles from triplicate XY *Sf1:*

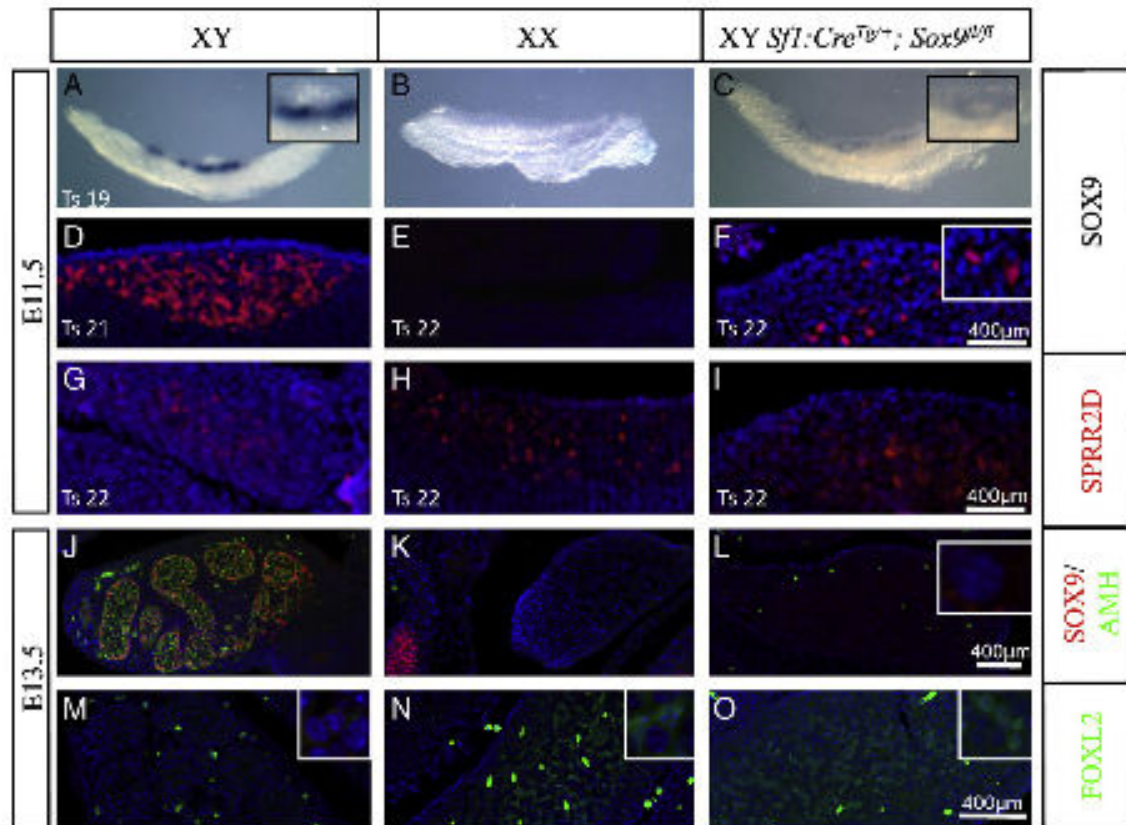


Fig. 1. *Sox9* expression analysis in XY *Sfl:Cre^{Tb1}*; *Sox9^{fl/fl}* embryonic gonads. (A–C) Whole mount *in situ* hybridization analysis using a *Sox9* antisense probe at E11.5 in (A) XY control urogenital ridge, (B) an XX control and (C) an XY mutant. Immunofluorescence detection of SOX9 protein in E11.5 (D) XY control urogenital ridge, XX controls (E) and (F) XY mutant urogenital ridge. SPRR2D, a gonad specific marker shows expression in the urogenital section in these shown in D,E,F. At E11.5 XY gonads (C) show polar expression whereas SPRR2D pattern of expression is more even in XX wild-type (E) and XY mutant (F). (G–I) SOX9 and its direct target AMH are expressed in XY wild-type E13.5 gonads (J) but absent in XX (K) and XY mutant gonads (L). The ovarian FOXL2 protein was detected in E13.5 XX (M) and XY mutant gonads (O) but absent in the XY wild-type gonad (N) indicating that complete sex reversal has occurred.

Cre^{Tb1}; *Sox9^{fl/fl}* (XY_KO), XY *Sox9^{fl/fl}* (XY_WT) and XX *Sox9^{fl/fl}* (XX_WT) gonads were determined and compared to each other. Standard data quality control procedures revealed homogeneous hybridization patterns (Supplemental Fig. 1A) and the expected range of signal distributions across the sample set (Supplemental Fig. 1B). We analyzed global expression signals using a distance matrix and a dendrogram and found the sample triplicates to be grouped together; overall, XY mutant and XY wild-type transcriptomes were clustered together and XX wild-type was separated (Supplemental Fig. 1C).

To carry out three two-way comparisons (XY_KO versus XX_WT; XY_KO versus XY_WT; XY_WT versus XX_WT) we first identified for each sample pair the probe sets for which signals above the cut-off were observed (6,935 log₂ units; Supplemental Fig. 2A). We next selected genes significantly differentially expressed (≥ 2 -fold change; limma test, FDR adjusted p -value ≤ 0.05) and split them into two groups showing increasing or decreasing signals (wild-type versus mutant) and increasing signals in XX or XY samples using the k-means clustering algorithm ($n=2$). We found 379 genes significantly differentially expressed between XY wild-type and mutant gonads. Among them 151 genes showed increased signals and 228 genes showed decreased signals, respectively, in the XY mutant as compared to the XY control (Supplemental Fig. 2A, middle column). XY mutant versus XX wild-type identified 270 genes significantly differentially expressed including 168 showing stronger and 102 showing weaker signals in the XY mutant (Supplemental Fig. 2A, left). Finally, we identified 1047 genes

significantly differentially expressed between XX and XY wild-type samples including 428 which display stronger signals in males and 619 genes which display stronger signals in females (Supplemental Fig. 2A, right).

Selected genes required for ovarian differentiation like *Foxl2*, *Wnt4*, *Eya7*, *Wwp2*, and *Pt* showed stronger signals in XY *Sfl:Cre^{Tb1}*; *Sox9^{fl/fl}* gonads in comparison to XY gonads indicate ongoing female differentiation; they are shown in Table 1A. To validate the expression profiling analysis we examined the transcription of selected genes by whole mount *in situ* hybridization. Four genes expressed in Sertoli cells (*Sox9*, *Sox10*, *Pgals*, and *Pg9*), and one each expressed in Leydig cells (*P450sc/Cyp11a1*) and pre-anthelagous (*Arh9*) yielded positive signals in XY gonads but not in XX wild-type and show an intermediate level of expression in XY mutant samples (Table 1D). Consistently, mRNA from loci known to be expressed in females (*Rspo1*, *Bmp2*, *Brs2*, *Pg19* and *Stro1*) were detected in XX wild-type and in XY mutant gonads (Supplemental Fig. 3).

We subsequently correlated expression signatures with male, female and XY mutant phenotypes by organizing these genes into 11 classes using Venn diagrams (Supplemental Fig. 2B). The first four classes comprise genes that show peak signals in XX wild-type, intermediate signals in the XY mutants and the weakest signals in XY wild-type samples (Fig. 1A). Consistently, Class 1 (124 genes) is enriched for genes bearing the Gene Ontology annotation terms such as Chromosome organization involved in meiosis (GO:0070192, 4 observed/0 expected by chance, p -value 2.75×10^{-5}), and Meiosis

Table 1
Comparative expression analysis of genes involved in ovarian and testicular development.

Gene name	Entrez gene ID	XY_KO vs XY_WT	XY_KO vs XX_WT	XY_WT vs XX_WT
(A) Expression of genes involved in ovarian development at E13.5				
<i>Foxl2</i>	26927	1.21	-0.08	1.29
<i>Wnt4</i>	22417	1.13	0.28	0.85
<i>Rspo1</i>	192199	1.38	-0.12	1.50
<i>Brnp2</i>	12156	2.14	-0.53	2.67
<i>Fox</i>	14313	3.61	-0.28	3.89
(B) Expression of genes involved in germ cell development at E13.5				
<i>Rec8</i>	56739	2.57	-0.43	3.00
<i>Stra8</i>	20899	3.32	-0.45	3.77
<i>Sycp3</i>	20962	2.33	-1.78	4.11
<i>Dmc1</i>	13404	2.01	-1.40	3.41
<i>Dazl</i>	13164	0.28	-0.11	0.39
<i>Nanos3</i>	244551	-0.52	0.27	-0.79
<i>Pou5f1/Oct4</i>	18999	-0.58	0.71	-1.29
<i>Nanos2</i>	378430	-1.20	0.62	-1.82
<i>Tdrd1</i>	83561	-0.23	-0.08	-0.15
<i>Dmrt3l</i>	54427	-0.21	0.28	-0.49
(C) Expression of Y chromosome genes at E13.5				
<i>Ube1yf</i>	22202	0.41	5.40	-4.99
		0.17	4.37	-4.20
		0.03	2.49	-2.46
<i>Rbm1af</i>	19657	-0.04	2.41	-2.45
		-0.10	1.60	-1.70
<i>Sry</i>	21674	0.70	0.51	0.19
<i>Zfy1</i>	22767	0.63	1.68	-1.05
<i>Zfy2</i>	22768	0.22	0.37	-0.14
(D) Expression of genes involved in testis differentiation				
<i>Sox8</i>	20681	-1.03	0.3	-1.33
<i>Sox10</i>	20665	-0.47	0.11	-0.58
<i>Pgds/Pgds</i>	19215	-1.98	0.2	-2.18
<i>Igf9</i>	14180	-0.57	0.23	-0.80
<i>Cyp11a1/P450Sc</i>	13070	-4.65	1.7	-6.35
<i>ErbB3</i>	13867	-1.35	0.37	-1.72
<i>Dhh</i>	13363	-2.21	0.21	-2.42
<i>Dmrt1</i>	50796	-0.30	0.30	-0.6
<i>Sry</i>	21674	0.70	0.51	0.19
<i>Amb</i>	11705	-4.34	1.26	-5.60
<i>Tmem184a/Sdmg1</i>	231832	-2.40	2.67	-2.67
<i>Pch1</i>	19206	-1.57	-0.04	-1.53
<i>Hsf17b1</i>	15485	-1.04	0.76	-1.80
<i>Hsf3b1</i>	15492	-2.40	0.22	-2.62

The given values are the log₂ of the indicated fold change.

(0007128, 5/1, 1.79×10^{-3}). Class 2 (362 genes) is also enriched for Chromosome organization involved in meiosis (0070182, 3/0, 5.6×10^{-3}) as well as Reproduction (0000003, 25/9, 5.31×10^{-2}), Female gamete generation (0007292, 5/1, 4.85×10^{-3}), Regulation of signal transduction (0009966, 23/9, 1.15×10^{-2}) and Negative regulation of apoptosis (0043068, 11/3, 5.5×10^{-2}). Class 3 contains only 18 genes but is still enriched for Chromosome organization involved in meiosis (0070182, 3/0, 2.8×10^{-2}), Meiosis (0007126, 4/0, 6.7×10^{-3}), and Gamete generation (0007276, 5/0, 6.27×10^{-2}) while Class 4 (125 genes) is enriched only for Meiosis (0007126, 7/0, 3.7×10^{-2}).

The next three classes shown in Fig. 2B identify genes for which we find the strongest signals in XY wild-type and the weakest in XX wild-type samples while XY mutants show intermediate signals (C5 and C6) or equivalent signals as the XY wild-type (C7). Class 5 (212 genes) is enriched, among others, for Sex differentiation (0007548, 8/1, 10.0×10^{-4}), Spermatogenesis (0007283, 8/3, 6.8×10^{-3}), Steroid metabolic process (0008202, 10/2, 1.7×10^{-2}), and Regulation of apoptosis (0042981, 13/5, 2.8×10^{-3}) and Class 6 (155 genes) was found to be enriched for Embryonic morphogenesis (0048598, 10/3, 1.3×10^{-2}), Cell differentiation (0030154, 25/10, 2.5×10^{-2}) and also

Steroid metabolic process (0008202, 6/1, 1.8×10^{-2}). Class 7 contained 64 genes but no GO term was found to be enriched.

Finally, we determined three classes shown in Fig. 2C that display insignificant signal differences between male and female gonads (which distinguishes this group from the others shown in Figs. 2A and B) and for which RNA concentrations in the XY mutant were either found to be closer to female (C8 and C10) or male (C9 and C11) gonads. Class 8 (9 genes) and Class 11 (46 genes) were not enriched for any GO terms. Class 9 (17 genes) and Class 10 (17 genes) were found to be enriched for genes associated with processes such as Cellular macromolecule metabolic process (0044260, 7/2, 9.9×10^{-3}), Cell proliferation (0008283, 3/0, 5.15×10^{-3}) and Anatomical structure morphogenesis (0009253, 4/1, 8.52×10^{-3}).

Sex reversal of newborn and adult XY *Sf1:Ov^{+/+}; Sox9^{fl/fl}* mice

Previous analyses using XY *Sox9* mutants could not be performed after E15.5 because of the early lethality of the *Sox9* mutant alleles used in these studies. In our model, however, we were able to investigate how XY mutant gonads develop at P0. Histological analysis of XY mutant gonads did not show sex cord formation as compared to the XY wild-type control (Fig. 3A). In addition, Sertoli cells were detected in the testicular tubules of XY control gonads but no signal was apparent in XX or XY mutant gonads using SOX9 or SOX9G1 which are nuclear and cytoplasmic markers of Sertoli cells, respectively (Fig. 3A). In contrast, FOXL2 immunostaining showed follicular cell differentiation in XX ovaries and in XY mutant gonads indicating that they develop an ovarian structure at P0 (Fig. 3A).

At E13.5, genes involved in the onset of meiosis such as *Rec8* and *Stra8* were up-regulated in XY mutant gonads in comparison to XY controls (Table 1). At P0, histological analysis revealed the presence of meiotic germ cells in XX wild-type and XY mutant gonads whereas XY quiescent gonocytes were found within the testicular cords in XY gonads. This is consistent with the outcome of our expression profiling analysis which indicated that meiosis was initiated in XX wild-type and XY mutant germ cells (Fig. 3A).

XY mutant mice exhibited female external genitalia once they reached adulthood but were otherwise healthy (Fig. 4). Macroscopic analysis of the urogenital system of seven-week-old mice revealed vaginas, uteri, oviducts and ovaries like XX females and no seminal vesicles, prostate, vas deferens, epididymus or testes as expected in males. Moreover, histological analysis showed that XY mutant gonads did not develop seminiferous tubules as expected in testis but rather ovarian follicles at different stages of maturation (Fig. 4). Oocytes were observed in some of the pre-ovulatory follicles. Furthermore, some corpus luteum was present in XY mutant mice suggesting that ovulation might have occurred. Taken together, these data indicate sex reversal of XY mutant mice.

Sox9 is dispensable for ovarian function

Sox9 expression has been detected in the inner layer of the theca cells suggesting a potential function for SOX9 in the ovary (Notamnikola et al., 2006). Moreover the *Sf1:Ov* transgene is expressed in the theca cells of the ovaries (Bingham et al., 2006) suggesting that *Sox9* could be depleted in ovarian cells. As a consequence we examined the level of *Sox9* expression in XX *Sox9^{fl/fl}* and XX mutant ovaries of four-week-old females using q-PCR. We found that *Sox9* expression was significantly reduced in XX mutant ovaries as compared to XX *Sox9^{fl/fl}* controls (Fig. 3B).

We sought to estimate the fertility of the XX mutants in comparison to XX *Sox9^{fl/fl}* control females. To this end, XX mutant and XX *Sox9^{fl/fl}* females were split into two groups based on their age, i.e. 1.5 to 3 months and 3 to 6 months (Fig. 3C). The average number of offspring obtained from XX mutant females was similar to XX controls with an average of 8 pups per litter in the four groups of females

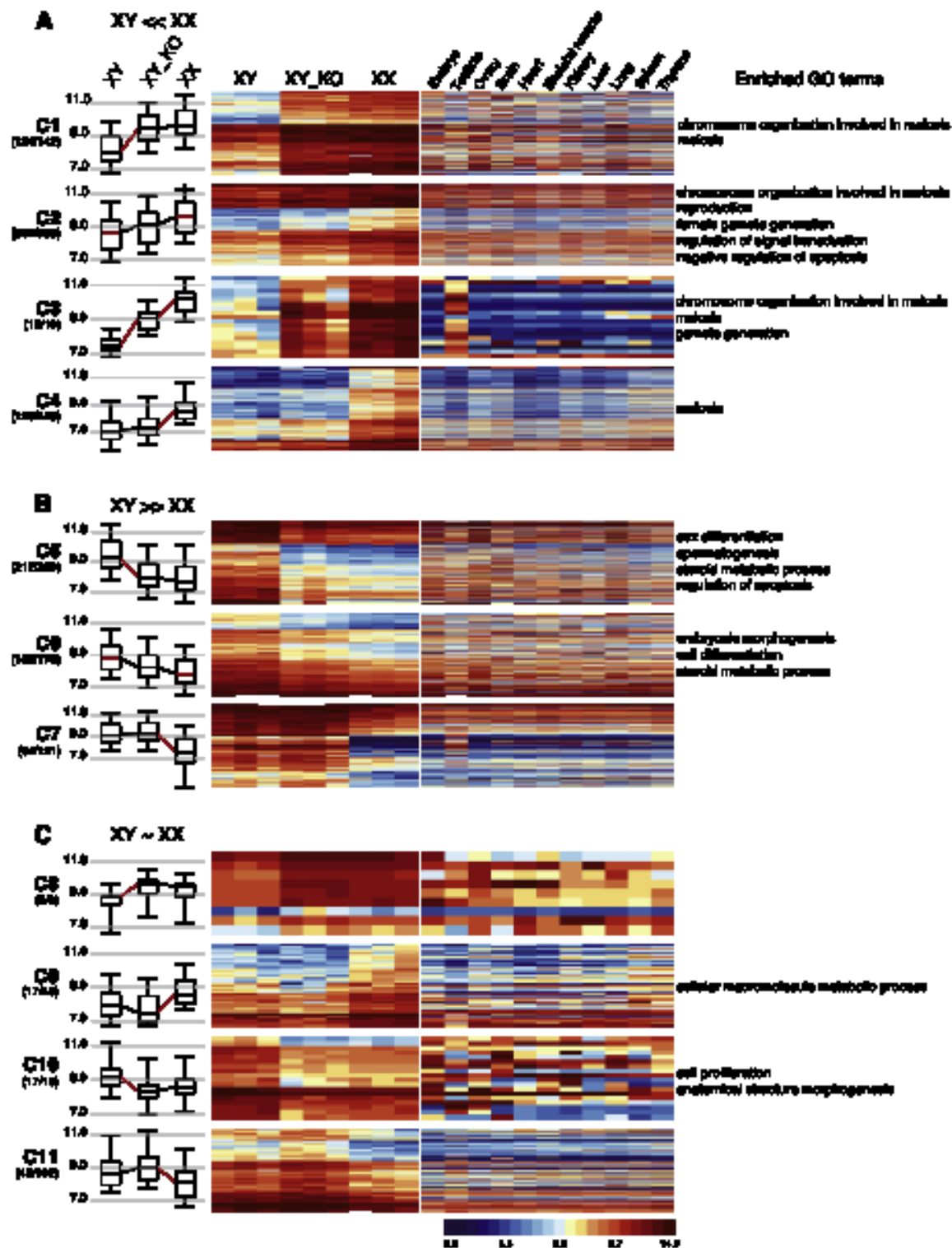


Fig. 2. Expression profiling of XY and XY versus XY mutant genes. (A) A heatmap is shown for triplicate samples from XY wild-type (XY), XY mutant (XY_KO) and XX wild-type (XX) samples. Four classes of genes are shown for which signals are weaker in XY wild-type than in XX wild-type (XY < XX). (B) Three classes are given for which signals are stronger in XY wild-type than in XX wild-type (XY > XX). (C) Four classes are shown for which no significant difference was observed between XY and XX wild-type samples (XY ~ XX). Expression classes are designated as C1 to C4. The number of genes versus corresponding probe sets displayed in each class is given in parentheses. Box plots display the log₂ signal distributions within three samples as indicated at the top. A black line in the box represents the median. Red lines indicate significant differential expression. Data from external mouse and adult testis samples (left panel) are indicated at the top. Examples of enriched GO terms are shown. A log₂ scale is given.

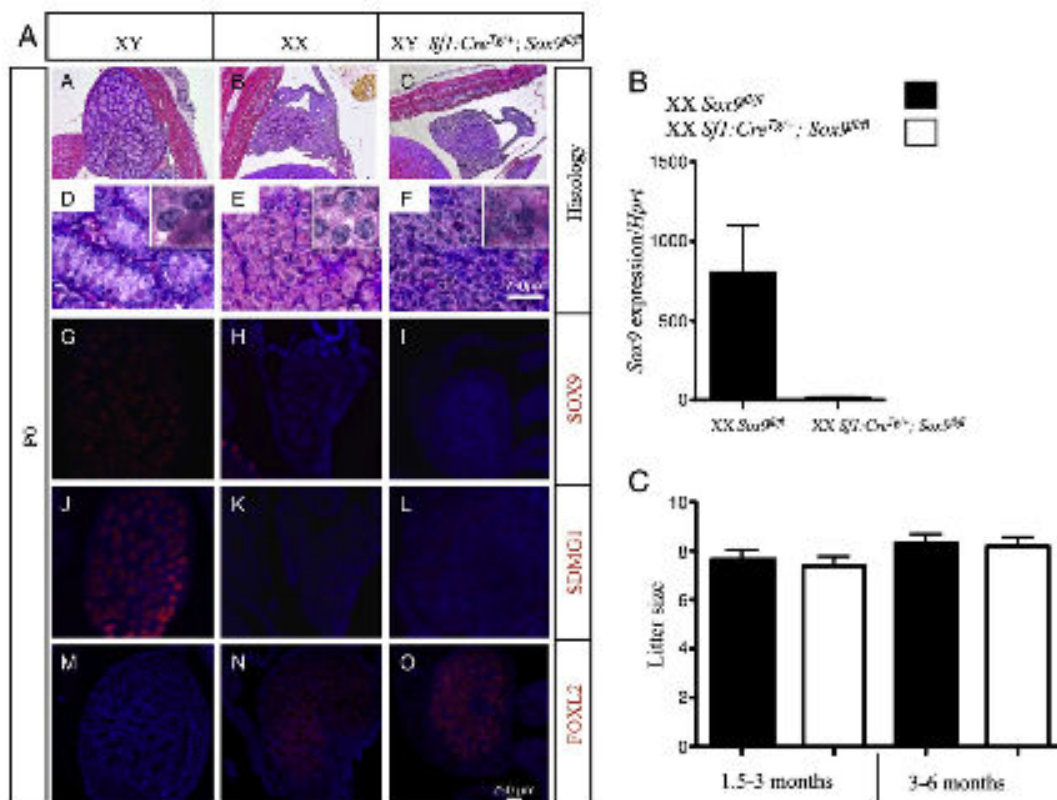


Fig. 5. Histological and immunofluorescence analysis on sagittal sections of gonads from wild-type XX, XX and XY Sf1:Cre^{T/+}; Sox9^{fl/fl} mice. (A)–(F) Hematoxylin and eosin histological analysis of gonadal sections. Low magnification $\times 10$ (A–C). High magnification $\times 100$ (D–F). XY testes (A) shows the presence of seminiferous tubules with sex cords containing spermatogenic germ cells as shown in inset. In contrast, XY mutant gonads (C) resemble ovaries (B) both consisting of aneuploid germ cells and highlighted in insets (E, F). (G–I) Immunofluorescence analysis using male and female specific markers. (G–I) Immunofluorescence for SOX9 (red) a marker of Sertoli cell nuclei was detected in the XY controls (G) but not in XX (H) or transgenic gonads (I). (J–L) Detection of SOX11 (red), a marker of Sertoli cell cytoplasm was evident in the XY controls (J) but not in XX (K) or transgenic gonads (L). (M–O) FOXL2 (red) a marker of ovarian somatic cells was detected in XX wild-type gonads (M) and not in XY control gonads (N). In gonads of XY mutant females, (O) FOXL2 was detected, showing a less organized pattern of expression compared to XX control gonads. Sox9 is dispensable for ovarian function (B) Q-PCR of Sox9 expression in XX mutant ovaries ($n = 8$) as compared to XX Sox9^{fl/fl} controls ($n = 8$) ($P = 0.0036$). (C) The litter size obtained from 1.5 to 3 month or 3–6 months old XX Sox9^{fl/fl} female ($n = 31$ and 25, respectively) versus XX mutant females ($n = 32$ and 34 respectively) ($P = 0.691$) and ($P = 0.831$).

(Fig. 3C). This suggests that Sox9 expression in ovaries and more generally in Sf1:Cre expressing cells is not required for fertility.

XY Sf1:Cre^{T/+}; Sox9^{fl/fl} females are subfertile

We next investigated whether the XY mutant females are fertile. Ten XY mutant animals were crossed with a XY Sox9^{fl/fl} wild-type male and three females produced one pup, two pups and two litters of four and two pups each. The genotype of the surviving mice was XX Sf1:Cre^{T/+}; Sox9^{fl/fl} (2), XX Sox9^{fl/fl} (6) and XY Sf1:Cre^{T/+}; Sox9^{fl/fl} (2). One of the XX mutant mice was used for subsequent mating experiments and was found to produce two viable litters. This shows that XY mutant females are fertile, albeit at a reduced level.

XY Sf1:Cre^{T/+}; Sox9^{fl/fl} females produce a reduced number of oocytes

We subsequently investigated the causes for the poor fertility observed in XY mutant females. MVH (Mouse Vasa Homologous), a marker of XX and XY germ cells (Tanaka et al., 2000), confirmed the presence of germ cells in XY mutant gonads that were mainly localized around the cortical region of the gonads in comparison to XX controls at P0 and P7 but not at E17.5 (Fig. 5A). In addition, quantification of germ cells showed fewer of them in XY mutant gonads than in XX controls at P0 and P7 (Fig. 5B). In summary,

although XY mutant gonads develop into ovaries, they, however, contain a lower number of germ cells than normal control ovaries.

To determine if XY mutant females are able to produce fertilized oocytes, ovarian stimulation was performed using three groups consisting of five XX Sox9^{fl/fl} females, six XX mutant females and six XY mutant females each (Fig. 5D); all animals were seven weeks old. Although we found variations in ovarian size between different XY mutant females, the ovaries of these females were smaller than XX mutant ovaries (Fig. 5C). This is likely due to the reduced number of oocytes present in them (Fig. 5A). A total of 126 (from five XX Sox9^{fl/fl} females), 160 (six XX mutant females) and 56 (six XY mutant females) oocytes or embryos were collected. On average nine oocytes or fertilized embryos were recovered per XY mutant female two days after the super-ovulation (Fig. 5D). In comparison, we recovered an average of 25 and 26 oocytes or embryos from XX Sox9^{fl/fl} and XX mutant females respectively. We conclude that XY mutant females produce substantially fewer oocytes or embryos after super-ovulation than XX controls.

The development of embryos from XY Sf1:Cre^{T/+}; Sox9^{fl/fl} females is partially impaired

Using B6Ytm male-to-female sex reversal mice it was shown that XY oocytes do not complete Meiosis II resulting in infertility of these XY females (Ohata et al., 2008). Consistently, 95% of *in vitro* cultured XY

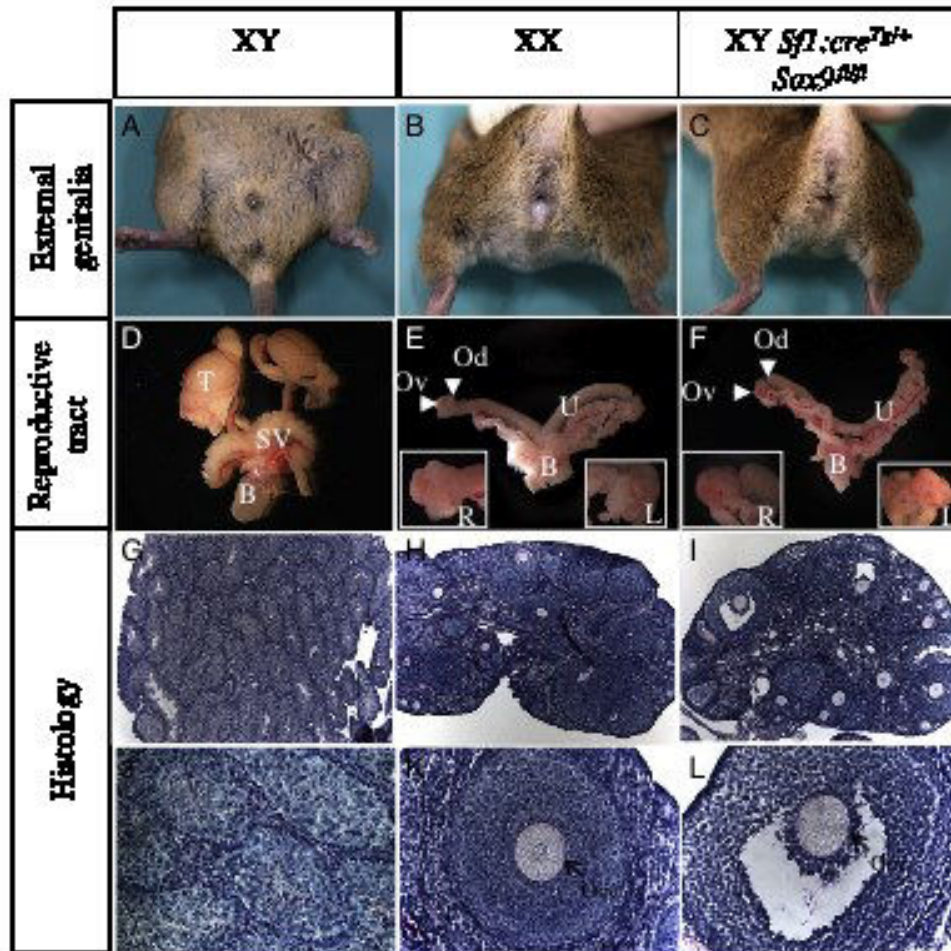


Fig. 6. Sex reversal in adult XY *Szf1:Cre^{fl/y+}*; *Sox9^{fl/fl}* transgenic mice. (A, B, C) External genitalia of 7-week-old control XY, XX mice and XY mutant transgenic mice respectively. (D, E, F) Reproductive tracts dissected from control XY, XX mice and XY mutant transgenic mice respectively. (F) showed the entire characteristics of XX females (B): vagina, uterus, oviducts and ovaries but no seminal vesicles, prostate, vas deferens, epididymis or testis as expected in male (D). T: testis, SV: seminal vesicle, B: bladder, Ov: ovary, Od: oviduct, Ut: uterus, R: right ovary, L: left ovary. (G–I) Hematoxylin and eosin histological analysis of gonadal sections. Low magnification X10 (G–I). High magnification $\times 100$ (J–L). (G) shows acellular tubules of the XY testes and (I) the presence of spermatogenic cells. XX gonads (H) show all stages of folliculogenesis including oocytes (K) as observed in the XY mutant transgenic mice (L, M).

oocytes from this line did not reach the two-cell stage embryo (Villemare et al., 2007). Therefore we investigated oocyte development in XY mutant females. Oocytes/embryos from super-ovulated XX *Sox9^{fl/fl}* and XY *Szf1:Cre^{fl/y+}*; *Sox9^{fl/fl}* mutant mice were collected at 1.5 day post-hCG injection (dpi). XY mutant oocytes showed more morphological abnormalities than XX *Sox9^{fl/fl}* oocytes; we observed a high degree of vacuole, granulation, fragmentation and abnormal division (Fig. 6D) as compared to XX *Sox9^{fl/fl}* oocytes (Fig. 6A). To visualize microtubules and chromosomes oocytes were stained with α -Tubulin and DAPI (Figs. 6E and F). At Meiosis II normal barrel-shaped spindle formation around the second metaphase chromosomes was observed in XX *Sox9^{fl/fl}* (Fig. 6E) and XY mutant oocytes as previously described in the *B6.Y²³* background (Villemare et al., 2007).

We subsequently investigated whether oocytes from XY mutant females were able to develop into two-cell stage embryos after fertilization. Out of 126 XX *Sox9^{fl/fl}* and 180 XY mutant oocytes/embryos we analysed, 102 (81%) and 137 (88%) were scored as being at two-, to eight-cell stages, respectively (Fig. 5D). In contrast, 41 (73%) embryos from XY mutant had reached at least the two-cell stage. The embryos were cultured for another 24 h and out of 102 XX *Sox9^{fl/fl}*, 137 XX mutant and 41 XY mutant embryos recovered, 57

(56%), 73 (53%) and two (5%) reached the morula-, or blastocyst stage *in vitro*, respectively (Fig. 5D).

Finally, two-cell stage embryos from super-ovulated XY mutant females and XX *Sox9^{fl/fl}* controls were collected at 1.5 dpi and cultured over night prior to immunostaining. While most XY mutant oocytes progressed through Meiosis II, abnormal two-cell stage division defects were prevalent. We also observed large nuclei, blastomeres with multiple nuclei, cleavage abnormalities and nuclear material which appeared to be unable to condense (Figs. 6E–F) as compared to XX *Sox9^{fl/fl}* (Fig. 6C). Taken together, these results show that XY mutant ovaries contain fewer ovulated oocytes in comparison to XX controls and that a population of embryos from XY females cannot develop beyond the two-cell stage.

Discussion

This present study used the *Cre/loxP* recombination system to delete *Sox9* from embryonic XY gonads and we present several pieces of evidence at both the RNA and protein level at different developmental stages that the *Sox9* locus was indeed efficiently and specifically removed from the target tissue (see Fig. 1). In contrast to

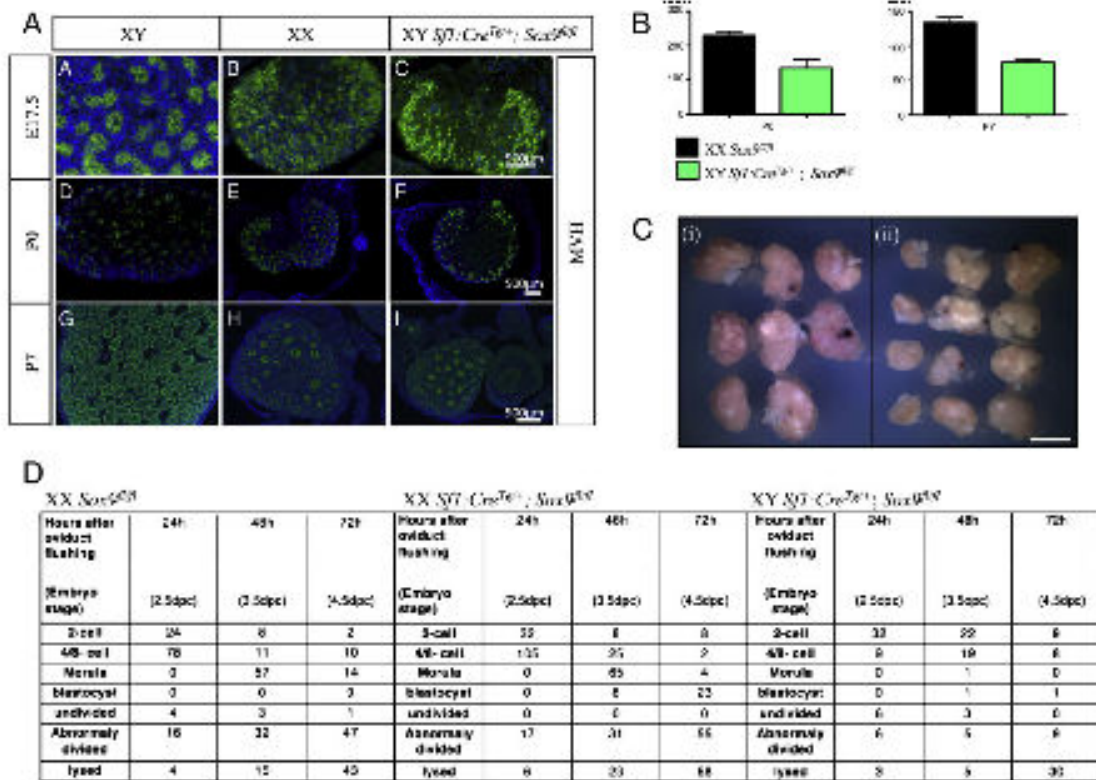


Fig. 5. XY *Sfr1:Cre^{Tg}; Sox9^{fl/fl}* females are infertile. (A) Reduction and sequestering of XY mutant ovarian germ cell to the cortical region of the XY ovary. Immunofluorescence staining showed a reduction of MVH positive cells in the cortical region of XY mutant ovary compared to XX wild-type ovary at E17.5, P0 and P7 (A–I). (C) Reduction of the number of germ cells in the whole ovary of XY mutant (P0 and P7; n=3) when compared to XX controls. (C) Age matched oocytes from XX mutant females and XY mutant females were collected after dissection. (D) Oocytes from age matched XX *Sox9^{fl/fl}*, XX mutant and XY mutant females were collected 2.5dpc and cultured in vitro for up to 72 h. A total of 126, 180 and 55 oocytes/embryos were collected from XX *Sox9^{fl/fl}*, XX mutant and XY mutant females, respectively. An average of 9, 25 and 26 oocytes was collected from XY mutant, XX *Sox9^{fl/fl}* and XX mutant females.

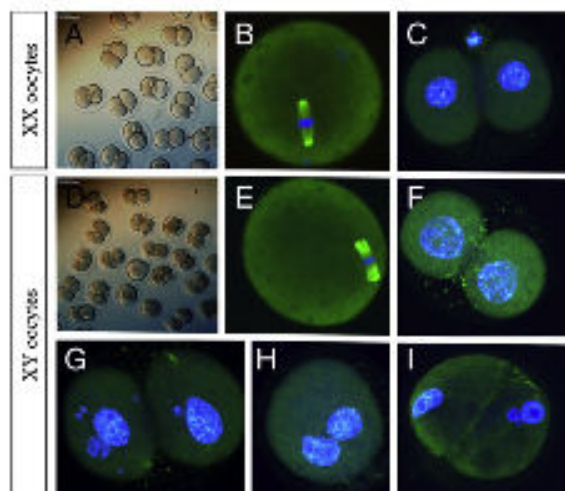


Fig. 6. In vitro monitoring of XX *Sox9^{fl/fl}* and XY *Sfr1:Cre^{Tg}; Sox9^{fl/fl}* oocytes by immunocytochemical staining. The morphology of fertilized XY mutant oocytes at 2.5 dpc showed the presence of a high level of vacuoles, granulation, hypergranulation and abnormal division (D) compared to XX *Sox9^{fl/fl}* oocytes (A). Oocytes prior to the two-cell stage development were isolated from XX controls and XY mutant females followed by immunocytochemical staining with tubulin and DAPI (B and E). At Metaphase II normal bipolar-plate spindle formation was observed in XX *Sox9^{fl/fl}* (B) and XY mutant oocytes (E). While most XY mutant oocytes progressed through Metaphase II, abnormal two-cell stage division defects were more prominent, large nuclei/irregularity of nuclear material in centrosomes (F), multipolar kinetochores (G), cleavage abnormalities (H and I).

previous studies (Barriocanes et al., 2006; Chabrisier et al., 2004), the combination of the *Sfr1:Cre* transgene (Bingham et al., 2006) with the conditional knockout allele of *Sox9* did not result in a lethal phenotype. In addition to the gonad, the *Sfr1:Cre* transgene is also active in the anterior pituitary, spleen, and the adrenal gland (Bingham et al., 2006). *Sox9* expression has not been described in spleen and the adrenal gland (Wright et al., 1995) implying that it plays no role in these organs. Although *Sox9* is expressed in the pituitary (Fauquier et al., 2008), ablation of *Sox9* using the *Sfr1:Cre* does not seem to affect this tissue in XY mutant mice. This enabled us to study the fate of the XY bipotential gonad in the absence of *Sox9* during adult development.

Early ablation of *Sox9* in XY gonads prevents testis cord formation and XY mutant gonads express genes that are up-regulated in XX wild-type gonads like *Wnt4* or *Pt1*. It has been shown genetically that *Wnt4* is an antagonist of *Fgf9*, a gene involved in ovarian and testicular differentiation (Kim et al., 2006). *Wnt4* is up-regulated by the *Kspo1*/β-catenin signalling pathway in ovaries (Chapot et al., 2008) while *Fgf9* up-regulation requires *Sox9* expression in the XY gonads (Kim et al., 2006). In addition β-catenin and *SRY/SOX9* are antagonists during sex determination (Chapot et al., 2008; Meestrik et al., 2008; Bernard et al., 2008) indicating that ablation of *Sox9* allows WNT/β-catenin signalling to promote ovarian formation. This is accompanied by a down-regulation of genes required for testis development.

In XY *Sox9* loss-of-function mutant gonads, Sertoli cell differentiation defects were revealed by reduced expression of Sertoli cell markers. Although *Sox9* expression is restricted to the Sertoli cell lineage, male steroidogenic cell markers were not expressed which

implies that Leydig cells fail to differentiate in XY mutant gonads. The *DNH3/PITRM1* signaling pathway was shown to be important for fetal Leydig cell development (Yan et al., 2002). Thus, lack of *Dhh* transcripts in XY mutant gonads is likely responsible for impaired Leydig cell differentiation. As a consequence, testicular hormones which are secreted by Leydig cells are absent and male reproductive organ development is not stimulated. Instead, the Mullerian ducts develop into female genitalia. This is promoted by the absence of the anti-mullerian hormone normally expressed in Sertoli cells (Arango et al., 1999) in a manner dependent upon *SOX9* (De Santa Barbara et al., 1998).

The most important outcome of the mRNA profiling experiment was the finding that XY mutant gonads at E13.5 show an intermediate transcript signature resembling both XY wild-type and XX wild-type gonads. Our data indicate that *Sox9* removal was likely complete in the tissues investigated; as a consequence this pattern possibly indicates that the male developmental pathway is not completely shut down at this stage (E13.5) while the female one is not completely active in the XY mutant. It is a non-trivial task to interpret the output of a GeneChip experiment which analyzes complex tissue samples including distinct cell types since mRNA concentrations depend both on transcriptional events and fluctuating cell populations. It is, however, possible to discern overall patterns as we have recently demonstrated in a study of late onset infertility caused by Sertoli cell specific deletion of *Sox9* (Lardenois et al., 2010).

It is noteworthy that some transcripts are present in the XY mutant sample at concentrations very close to what is observed in XX wild-type (C1 and C3), while others are more similar to XY wild-type samples (C6 and C7). Specifically, XY mutant gonads show significantly weaker mRNA concentrations of Sertoli cell marker genes such as *Sox9* (Kent et al., 1996; Morab de Silva et al., 1996), *Dhh* (Bilgoud et al., 1996), *Trox2/H4/Sirg1* (Buet et al., 2008), *Ahr1* (Bakrings et al., 1990), and *Sox8* (Sack et al., 2001). Moreover, weaker signals were found for genes involved in Leydig cell differentiation like *Pck1* (Bilgoud et al., 1996) or in Leydig cell steroidogenesis like *Cyp17a1*, *Cyp11a1*, *Hsd17b3* and *Hsd3b1* (Halkic et al., 2005). In contrast, genes expressed in somatic ovarian cells showed stronger signals in XY mutant gonads and in the XX controls compared to XY controls like *Rspo1* (Parma et al., 2006), *Wnt4* (Vainio et al., 1999), *Pt* (Yao et al., 2004) and *Rorb2* (Pailhoux et al., 2002) (Table 1). This was also the case of genes involved in meiosis such as *Rac1*, *Spo11*, *Tsc1*, *Msh4*, *Msh5* and *Stra8* (Bakrins et al., 2008). Note that *Cyp26b1*, which has been implicated in the direct and indirect control of meiosis at different developmental stages displays a significantly weaker signal in the XY mutant sample as compared to the XY wild-type (Class 5) (Bowles et al., 2006; Kumar et al., 2011; MacLennan et al., 2007). This is consistent with its role in maintaining male germ cells in an undifferentiated state (Li et al., 2009). Taken together, these data are consistent with the notion that germ cells in XY mutant gonads have initiated (the female form of) meiosis as part of their sex reversal phenotype.

Previous work showed that *Sox9* expression occurs transiently in steroidogenic cells of the ovaries (Notaromita et al., 2006). However, depletion of *Sox9* in XX mutant ovaries has no dramatic effect on the fertility. While *Sox9* is essential for murine testis differentiation, we show here that it is dispensable for functional ovarian development. At E13.5, germ cells have entered meiosis in ovaries in contrast to pre-spermatogonia in foetal testis which are quiescent from E14.5 onwards (Wu et al., 2008). Indeed, meiotic mRNAs were found at higher concentrations in XY mutant gonads in comparison to XY *Sox9*^{fl/fl} gonads indicating that XY germ cells had initiated meiosis. It is conceivable that the intermediate expression pattern observed for XY mutants is a reflection of insufficient female germ cell development. Indeed, at birth, the number of oocytes is lower in XY mutant ovaries in comparison to XX controls. This reduction in the number of oocytes has been described in ovaries in B6YTM sex-reversed mice (Alton et al., 2006) and in XO females (Burgoyne and Baker, 1981; Burgoyne

and Baker, 1985). This occurs around birth when oocytes are at the pachytene stage. Both X chromosomes are active during prophase and this is maintained through processes involving homologous synapsis (Burgoyne et al., 2009). Lack of homologous synapsis due to a single X chromosome in XO or XY oocytes might promote silencing of that single X chromosome which might affect oocyte survival. It is conceivable that recombined X chromosomes escape silencing thereby enabling a sub-population of XO and XY oocytes to persist.

In females, oocytes promote follicle formation (Galgon and Mager, 2006). Oocytes can form independently of their sex chromosome constitution. Indeed, the Y chromosome has been visualized in oocytes of XXY females (Palmer and Burgoyne, 1991). When the capacity of XY oocytes to be fertilized was analyzed using B6YTM mice it was found that XY oocytes were incompatible with normal fertilization and development: the oocytes eventually enter interphase but rarely reach the two-cell stage due to deficient Meiosis II spindle assembly (Obata et al., 2008; Villanar et al., 2007). This defect was overcome by transfer of the nucleus of XY oocytes into wild-type XX ooplasm suggesting that the XY ooplasm is incompetent for fertilization in B6YTM mice. The B6YTM sex-reversed mice (from the cities of Pouchurins, B6YTM or Tirano B6YTM) were generated by introducing different variants of the Y chromosome of *Mus domesticus* into a *M. musculus* [C57BL/6J] background (Elcher and Washburn, 2001). The Y chromosome in our XY mutant females (C57BL/6J; 129SV mixed background) does not seem to have a similar effect on XY ooplasm because the dramatic loss of embryos in these females occurs at later stage than in B6YTM which might be a consequence of the different strain backgrounds used. Indeed, 73% fertilized oocytes from XY mutant females reached at least two-cell stage, in comparison to 81% or 86% of the embryos coming from XX *Sox9*^{fl/fl} and XX mutant females respectively. Thus most of the XY oocytes from XY mutant females are able to pass meiosis but fail to develop further than the first embryonic divisions.

Although defects in sex chromosomal segregation result in lethal aneuploidy in XY oocytes or XO oocytes, additional defects have been found. XO mice can be also poorly fertile because the two-cell stage embryos from XO oocytes cannot pass further divisions and become abnormal (Burgoyne and Biggers, 1976). This suggests that both X chromosomes are required for the first stages of embryonic development. Indeed, XY mutant females exhibit also a poor oocyte quality which precludes the first mitotic divisions. When comparing XXY and XYY females (Mahadeviah et al., 1993) found that XXY females were more fertile than XYY suggesting that the Y chromosome has a negative effect on the capacity of XY oocytes to undergo embryonic development. Altogether this suggests that XY mutant female fertility is hampered because of X dosage deficiency and potentially by the presence of the Y chromosome. Interestingly, a recent study has shown that the X chromosome appeared to interfere with genome-wide expression by regulating hundreds of autosomal genes through epigenetic processes (Wijchers et al., 2010). Expression of maternal factors is required for early embryonic development but whether the expression of these genes is influenced by the sex chromosome remains to be elucidated (Zheng et al., 2010).

In spite of their infertility phenotype some XY mutant females are able produce offspring: two out of 10 females gave birth to a single pup and one female had two litters of four and two pups each. This is comparable to XY females since three out of twelve females produced at least one pup (Mahadeviah et al., 1993). Some XY fertile females have also been found in mare (Kent et al., 1988) and while this phenomenon is rarely found in humans one case was recently reported: retarded sexual development of her daughter motivated a patient to undergo a genetic analysis which showed that the karyotype of the daughter was 46,XY (100% of the blood cells tested) and 46,XY (98.25%), 45,X (0.75%) in the gonads. The mother's karyotype was 46,XY (100% of the blood cells) and 46,XY (92.9%), 45,X (5.9%), 46,XX (0.6%), 47,XXY (0.6%) in gonadal cells suggesting

that this XY female represents an example for an individual who was able to procreate (Dumic et al., 2008).

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.ydbio.2017.03.029.

Acknowledgments

We would like to thank Anne-Anastine Chassot for helpful discussions and Keith Parker for the *Sry::Cre^{ERT2}* mice, Michael Wegner and Ian Adams for the SOX9 and SOX11 antibodies, respectively. Microarray experiments were carried out using the facilities of the Nice-Sophia Antipolis Campus Platform. This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR-07-BLAN-0044, TESTSDEV) awarded to M.C.C. and Inserm Avancir grant RD7216NS awarded to M. P. R.L. was financed by Agence Nationale pour la Recherche (post-doctoral fellowship) and A. L. was supported by an Institut Young Investigator fellowship and an INSERM Storm grant (R10C2394V).

References

Albarran, M., Chabalier, M.C., Martin, J.F., Schell, A., De Crombrughe, B., 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of *Sox2* and *Sox3*. *Genes Dev.* 16, 2619–2624.

Albarran, M., Chabalier, M.C., Behringer, R.R., Rowitch, D.H., Schell, A., Sporn, J.A., de Crombrughe, B., 2004. Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8992–8997.

Almeida, M., Lau, M.P., Villeneuve, M., Takirin, T., 2006. The behavior of the X- and Y-chromosomes in the ovary during meiotic prophase in the *Drosophila* ommatidial ovary. *Reproduction* 132, 241–252.

Amara, M.A., Lovell-Badge, R., Behringer, R.R., 1998. Targeted inactivation of the endogenous mouse *Sry* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 95, 409–419.

Baltus, A.L., Menck, D.B., Hu, Y.C., Goodheart, M.J., Carpenter, A.E., et al., 2006. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat. Genet.* 38, 1430–1434.

Baron-Cado, F., Bagheri-Zadeh, S., Khattaj, J., Xia, X., Takeda, M.M., Bagheri, C., Scherer, G., 2008. Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice. *Mol. Reprod.* 21, 193–201.

Behringer, R.R., Cote, R.J., Rowitch, G.J., Pellicer, R.D., Behringer, R.L., 1990. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing an inhibiting substance. *Nature* 345, 167–170.

Berwald, P., Shi, H., Emerson, X., White, E., Esbey, V., 2008. Human *SRY* inhibits beta-catenin-mediated transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2829–2908.

Bird, D., Schreiber, D.A., Whitler, M., Pevsner, A.A., Adams, L.R., 2008. *String1* is a conserved transcriptional repressor associated with germ cell sex determination and germline-gene interactions in mice. *Development* 135, 1415–1425.

Bi, W., Huang, W., Whitworth, D.J., Ding, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 2001. Hypohomocysteinylase of *Sox9* results in defective cartilage maturation and premature skeletal mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6598–6603.

Blagovic, M.C., Verma-Schwarz, S., Pavesi, L.F., Parker, K.L., 2006. Development of a transcription factor 1/Cre transgenic mouse line. *Concepts* 44, 419–424.

Blubb, C.E., Whitworth, D.J., Qin, Y., Aguilera, A.J., Aguilera, L.J., Harrison, W.R., Behringer, R.R., Overstreet, P.A., 2004. A transgenic insertion upstream of *Sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet.* 26, 489–494.

Blyskal, M.J., Shen, L., McMillan, A.P., 1998. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* 8, 298–304.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Whittam, D., Richmond, J., Mistry, S., Yaktira, K., Chavakis, M., Wilson, M.J., Bayraktar, J., Hamada, H., Kempson, P., 2006. Notch1 signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312, 598–600.

Brich, S., Goshik, E.R., Hildebrandt, D., Peluso, R.J., Rosen, M., et al., 2007. The transcription factor *Sox9* is a key regulator of postnatal glial development. *Genes Dev.* 21, 66–78.

Burgoyne, P.S., Baker, T.G., 1991. Oocyte depletion in XO mice and their XX siblings from 12 to 200 days post partum. *J. Reprod. Fertil.* 61, 207–212.

Burgoyne, P.S., Baker, T.G., 1993. Perinatal oocyte loss in XO mice and its implications for the aetiology of gonadal dysgenesis in XO women. *J. Reprod. Fertil.* 73, 613–645.

Burgoyne, P.S., Higgins, J.D., 1978. The consequences of X-chromosome deficiency in the germ line: impaired development in vitro of preimplantation embryos from XO mice. *Dev. Biol.* 61, 109–117.

Burgoyne, P.S., Mahadeviah, K.K., Turner, J.M., 2008. The consequences of oogenesis for mammalian embryos. *Nat. Rev. Genet.* 9, 207–216.

Camargo, C.A., Lovell-Badge, R., 2002. *Sry* and sex determination: how long can it be? *Trends Genet.* 18, 111–113.

Chabalier, M.C., Kobayashi, A., Vidal, V.A., Lutz-Bonhart, S., van de Kant, H.J., Wegner, M., de Rooij, D.G., Behringer, R.R., Schell, A., 2004. Functional analysis of *Sox9* and *Sox2* during sex determination in the mouse. *Development* 131, 1891–1901.

Chabot, F., Prins, M., 2008. The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics* 9, 84.

Chabot, F., Bellard, A.D., Mitsuhashi-Matsuda, C., Ohno, S.S., Demergin, P., Gollard, A., Moore, J., Prins, M., Wolgemuth, D.J., Jager, B., Prins, M., 2007. The conserved transcription factor *Sox9* in human and rodent male gonadogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8545–8551.

Chassot, A.A., Basc, R., Cognigni, R.P., Rogues-Cajetan, H.L., Takeda, M.M., Demergin, P., de Rooij, D.G., Schell, A., Chabalier, M.C., 2008. Activation of beta-catenin signaling by *Sry* controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1264–1277.

Chiba, J., Green, R.P., Schmitt, J., Capel, B., Ouellet, D.M., 2001. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104, 875–889.

De Santa Barbara, P., Boncompagni, R., Bhat, R., Dechenoux, M., Marlet, B., Stalder, P., Scherer, G., Prins, M., Berta, P., 1998. Direct interaction of *SRY*-related protein SOX9 and pleiotropic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell Biol.* 18, 6823–6825.

Dumic, M., Liu-Sa, E., Lohoff, M.J., Cyster, J., Visc, C., Lujan, R., Minkinen, S., Wilson, J.D., McElreaney, R., New, M.J., 2008. Report of fertility in a woman with a predominantly 46, XY karyotype in a family with multiple disorders of sexual development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 182–186.

Ehrlich, R.M., Washburn, L.I., 2001. Does one gene determine whether a *CS9W46-XY(SO)* mouse will develop as a female or as an hermaphrodite? *J. Exp. Zool.* 298, 322–326.

Fenster, T., Kuroki, K., Dattani, M., Lovell-Badge, R., Robinson, I.C., 2008. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pleurothymic gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2907–2912.

Furuta, Y., Patten, D.W., Hagan, R.L., 1997. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124, 2203–2212.

Gallay, J., Collignon, J., Koppman, P., Capel, B., Ermacora, A., Munnichberg, A., Vireux, M., Gauthier, 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* 345, 245–250.

Gilman, C.J., Mayo, S., 2006. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Mol. Reprod.* 21, 430–438.

Gith, S.I., Wegner, M., 2008. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3080–3018.

Hellkötter, M., Franke, R., Mollat, F., Ruzic, P., Vucelja, J., et al., 2005. The partial female to male sex reversal in *Wnt-4*-deficient females involves increased expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology* 146, 4014–4023.

Houston, C.E., Ohta, J.M., Springer, J.W., Macpherson, R.L., Reed, M.H., Gilbert, E.F., Herrmann, J., Schmidt, A., 1983. The cambridge syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Macpherson et al. in 1971. *Am. J. Med. Genet.* 13, 3–25.

Huang, B., Wang, G., Ming, Y., Lamb, A.N., Bhat, J., 1998. Abnormal XX sex reversal caused by duplication of *SOX9*. *Am. J. Med. Genet.* 87, 340–343.

Ishizumi, K.A., Hobbs, R., Collins, F., Besser-Treacy, Y.D., Antonellis, E.J., Schett, U., Sved, T.P., 2003. Epigenetic reprogramming and accumulation of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.

Kent, M.G., Scaffner, R.N., Hunter, A., Hillier, S.G., Schreiner, W., Volley, B., Washet, S.S., 1988. XY sex reversal syndrome in the mare: clinical and histological studies. *M-Y phenotype*. *Hum. Genet.* 78, 321–328.

Kent, J., Whistley, S.C., Andrews, J.E., Strick, A.H., Kempson, P., 1986. A male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination. *Development* 122, 2813–2822.

Kim, Y., Kobayashi, A., Sekine, H., Drapeau, L., Brunson, J., Chabalier, M.C., Prins, M., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R., Capel, B., 2006. *Hgf* and *wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 4, e187.

Koppman, P., Munnichberg, A., Capel, B., Wilson, M., Lovell-Badge, R., 1988. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse both differentiation. *Nature* 336, 450–452.

Kramer, J., Chazot, C., Brode, Y., Cunningham, T.J., Zhao, X., Duester, C., 2011. Sex-specific timing of meiotic induction is regulated by *Cyp26b1* independent of retinoic acid signaling. *Mol. Cell.* 2 Online.

Landwehr, A., Chabot, F., Barbonneau, F., Demergin, P., Scherer, G., Prins, M., 2008. Profiling spermatogenic failure in adult testes bearing *Sox9*-deficient Sertoli cells identifies genes involved in spermiogenesis, inflammation and stress. *Exp. Mol. Endocrinol.* 3, 154.

Li, H., Maclean, C., Cameron, D., Chappell-Davis, M., Petrowski, M., 2008. *Cyp26b1* expression in murine Sertoli cells is required to maintain male germ cells in an undifferentiated state during embryogenesis. *PLoS One* 4, e49501.

Lovell-Badge, R., Robertson, E., 1980. XY female mice resulting from a fertilization error in the primary testis-determining gene. *Dev. Development* 108, 635–646.

Matsuda, D.M., D'Hagall, L., Alvarez, A., Parker, K.L., Takeda, M.M., Capel, B., 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2049–2053.

McLennan, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P., Petrowski, M., 2007. Agouti-like collection of germ cells in testes of *Cyp26b1* knockout mice. *Endocrinology* 148, 4340–4347.

Mahadeviah, K.K., Lovell-Badge, R., Burgoyne, P.S., 1993. *Thy*-negative XX, XXY and XYY female mice: breeding data and cytochemical complex analysis. *J. Reprod. Fertil.* 67, 151–160.

Mahadeviah, K.K., Demergin, P., Archibald, I.J., Costa, E.M., 2008. 46, XY disorders of sex development (DSD). *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 70, 173–187.

Menck, D.B., Nabrows, J., Page, D.C., 2008. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev. Biol.* 262, 303–312.

Merlet, B., Dechenoux, P., Barbonneau, F., Scherer, G., Arhata, X., Mollat, F., Maral, I., Gauthier, A., Georg, I., Khattaj, J., Bagheri, C., Kim, Y., Capel, B., Aguilera, N., Dente, Y., Bhat, R., Berta, P., Prins, M., 2006. The *PGZ* pathway, independently of *FGFR*, amplifies *SOX9* activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* 134, 1813–1821.

- Momoi et al. *Shimizu, S., Hachisue, A., Hasegawa, Y., Choudhury, P., Swain, A., Lovell-Badge, R., 1996. Sertoli expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14, 62–68.*
- Natarajan, C., Miki, S., Hara, F., Puvion, F., Nakatani-Ishimura, R., 2005. Transient expression of SOX9 protein during Sertoli development in the adult mouse ovary. *Comp. Exp. Pathol.* 5, 285–292.
- Ohno, Y., Mitsuura, M., Hara, T., Taketo, T., 2004. Translocation of Y chromosomes from XY female mice was made possible by the replacement of cytoplasm during oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13918–13923.
- Pollux, R., Vigier, B., Volant, D., Servel, R., Chelboux, S., et al., 2002. Oestrogens of female-to-male sex-reversed in XX polled goats. *Dev. Dyn.* 234, 98–101.
- Pollock, S.J., Burgoyne, P.S., 1991. XY Sertoli cells in the testes of XX/OY and XX/OO/OY mosaic mice. *Development* 111, 1017–1019.
- Parma, P., Hsu, C., Vidal, V., Chabrolat, M.C., Dellambra, E., et al., 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, site differentiation and malignancy. *Nat. Genet.* 38, 1304–1306.
- Qin, Y., Bishop, C.A., 2005. Sertoli is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sox. *Nat. Genet.* 14, 1221–1223.
- Schmieder, A., Miesler, C., Stecher, S., Schöppel, R., Lohrer, M., Casanova, M., Lightfoot, S., Mariani, W., Casanova, M., Hagg, T., 2006. The H90: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Biol.* 7, 3.
- Sekine, H., Lovell-Badge, R., 2000. Sex determination involves synergistic action of SOX9 and SOX1 as a specific Sox9 enhancer. *Nature* 403, 438–439.
- Sekine, H., Hsu, L., Mariani, W., Pinsky, G., Lovell-Badge, R., 2004. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SOX1 specifically in fetal cell precursors. *Dev. Biol.* 274, 271–279.
- Stocker, A.H., Hara, F., Pollock, M.S., Hewitson, J.R., Griffiths, R.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Hinchey, A.M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1998. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 395, 340–344.
- Sork, E., Schmitt, E., Herrmann-Bergauer, I., Brad, M.R., Wegner, M., 2001. Mitochondrial weight reduction is mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox2. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4021–4028.
- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, K., Kunitz-Pokel, Y., Nakamura, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Hara, T., 2000. The serum leucocyte of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14, 841–853.
- Uehata, S., Hattikida, M., Elgart, A., Chiu, M., McManus, A.P., 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature* 397, 405–408.
- Vidal, V.P., Chabrolat, M.C., de Barj, D.C., Jirouf, A., 2001. Sertoli induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28, 215–217.
- Wakamura, M., Chen, H.Y., Kurikawa, M., Egawa, R.A., Taketo, T., 2007. The presence of X- and Y-chromosomes in oocytes leads to impairment in the progression of the second meiotic division. *Exp. Biol.* 301, 1–13.
- Wasson, P.S., Miller, D.C., van den Berghe, J.A., Barlow, M., Stockie, A.H., 2004. Dynamic regulation of meiotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells* 26, 334–342.
- Witcher, P.J., Yandori, C., Purohit, S., Ahmed, M., Hatcher, N., Srethar, A., Burgoyne, P.S., Puvion, F., 2010. Sertoli dimorphism in mammalian sex chromosomes gene regulation is determined not only by Sox but by sex chromosome complement as well. *Dev. Cell* 18, 477–484.
- Witkins, D., Mariani, W., Bralford, S., Wilson, M.J., Curran, A.R., Rowland, A., Rowley, J., Mitsuura, M., Burgoyne, P., 2005. Sertoli cell differentiation is initiated by cell-autonomous and through paracrine signaling during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* 287, 111–124.
- Wright, E., Hargrove, M.B., Christensen, J., Cooper, L., Kim, J., Brown, T., Campuzano, U., Goodfellow, P., 1995. The Sox-related gene Sertoli is expressed during embryogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* 9, 23–30.
- Yan, H.H., Wenzel, W., Capel, B., 2003. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 17, 1433–1443.
- Yan, H.H., Matusik, M.M., Jurga, C.J., Mierke, D.B., Page, D.C., et al., 2004. Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev. Dyn.* 230, 210–215.
- Zhang, W., Guo, M., Shen, Y., Noda, T., Ogawa, W., Lian, E., Liu, E., 2010. Maternal phosphatidylinositol 3-kinase signaling is crucial for embryonic genome activation and preimplantation embryogenesis. *EMBO Rep.* 11, 890–895.

ARTICLE 2

—

**« Testicular differentiation occurs in
Absence of R-spondin1 and Sox9 in Mouse Sex
Reversal»**

PLOS Genetics
(2012)

2. Article 2- L'inversion de sexe des souris XX *Rspo1* mutantes peut avoir lieu en l'absence des déterminants testiculaires *Sry* et *Sox9*.

Résumé

Chez les mammifères, la détermination sexuelle mâle est gouvernée par l'expression de *Sox9*, alors que chez la femelle le développement des ovaires dépend de l'expression de *R-spondin1* (RSP01), un activateur de la voie de signalisation WNT/ β catenin . Des analyses génétiques de modèles murins ont montré que *Sry* et *Sox9* sont tous les deux requis et suffisants pour induire le développement testiculaire. Ces gènes sont considérés comme les déterminants majeurs de la voie de différenciation mâle. En outre, l'inversion de sexe chez les individus XX invalidés pour le gène *Rspo1*, concorde avec l'expression de *Sox9*, suggérant que ce facteur de transcription induit une différenciation testiculaire dans des conditions pathologiques. De manière inattendue, nous montrons que la différenciation testiculaire s'opère en l'absence de l'expression de *Sox9* chez les individus XX invalidés pour les gènes *Rspo1* et *Sox9* (XX *Rspo1*(KO)*Sox9*(cKO)). Ceci indique que *Sry* et *Sox9* ne sont pas indispensables à l'inversion sexuelle de type mâle XX chez les individus mutés pour *Rspo1*. Les analyses moléculaires suggèrent que l'expression de *Sox8* et *Sox10* permettent la différenciation testiculaire en l'absence de *Sox9* chez les souris *Rspo1*(KO)*Sox9*(cKO). De plus, également les souris XY *Rspo1*(KO)*Sox9*(cKO) présentent un développement testiculaire, nos résultats montrent que *Rspo1* est l'acteur principal de l'inversion de sexe de type femelle XY chez les souris XY *Sox9*(cKO). *R-spondin1* est donc un activateur essentiel du développement ovarien, non seulement dans des conditions normales, mais aussi dans les cas d'inversion de sexe. Ces résultats démontrent que la voie de différenciation mâle et la voie femelle sont toutes les deux induites par des voies génétiques actives et distinctes. Le dogme qui considère la voie de différenciation femelle comme une voie par défaut a donc besoin d'être révisé.

Testicular Differentiation Occurs in Absence of R-spondin1 and Sox9 in Mouse Sex Reversals

Roxane Lavery^{1,2*}, Anne-Amandine Chesnot^{1,2*}, Eva Pauper^{1,2}, Modile P. Gregoire^{1,2}, Maribel Klopffenstein³, Dirk G. de Rooij⁴, Manuel Merck³, Andreas Schedl^{1,2}, Norbert B. Ghyselinck³, Marie-Christine Chalouhian^{1,2*}

1 University of Nice-Sophia Antipolis, UPE Sciences, Nice, France, **2** INSERM U1061, CNRS UMR7277, IIR, Nice, France, **3** Department of Development and Stem Cells, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGMCC), CNRS UMR7104-INSERM UMR4, Illkirch, France, **4** Center for Reproductive Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Abstract

In mammals, male sex determination is governed by SRY-dependent activation of *Sox9*, whereas female development involves R-spondin1 (RSPO1), an activator of the WNT/beta-catenin signaling pathway. Genetic analyses in mice have demonstrated *Sry* and *Sox9* to be both required and sufficient to induce testicular development. These genes are therefore considered as master regulators of the male pathway. Indeed, female-to-male sex reversal in XX *Rspo1* mutant mice correlates with *Sox9* expression, suggesting that this transcription factor induces testicular differentiation in pathological conditions. Unexpectedly, here we show that testicular differentiation can occur in XX mutants lacking both *Rspo1* and *Sox9* (referred to as XX *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{KO}), indicating that *Sry* and *Sox9* are dispensable to induce female-to-male sex reversal. Molecular analyses show expression of both *Sox8* and *Sox10*, suggesting that activation of *Sox* genes other than *Sox9* can induce male differentiation in *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{KO} mice. Moreover, since testis development occurs in XY *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{KO} mice, our data show that *Rspo1* is the main effector for male-to-female sex reversal in XY *Sox9*^{KO} mice. Thus, *Rspo1* is an essential activator of ovarian development not only in normal situations, but also in sex reversal situations. Taken together these data demonstrate that both male and female sex differentiation is induced by distinct, active, genetic pathways. The dogma that considers female differentiation as a default pathway therefore needs to be definitively revised.

Citation: Lavery R, Chesnot AA, Pauper E, Gregoire MP, Klopffenstein M, et al. (2012) Testicular Differentiation Occurs in Absence of R-spondin1 and Sox9 in Mouse Sex Reversals. *PLoS Genetics* 8(12): e1003170. doi:10.1371/journal.pgen.1003170

Editor: Jennifer T. Lee, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical Institute, United States of America

Received: March 2, 2012; Accepted: October 30, 2012; Published: December 27, 2012

Copyright: © 2012 Lavery et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche QM10-BLAN4239-mechanisms, ANR-09-GENM-026-03 (EMBDON) and Association pour la Recherche sur le Cancer (SPR0104301488). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: marie-christine.chalouhian@unice.fr

© These authors contributed equally to this work.

Introduction

Mammalian sex determination depends on the primary developmental decision of the gonad to differentiate as testis or ovary. The gonad develops as a bipotential organ with the capacity to respond to two different genetic stimuli: the activation of the SRY/SOX9 pathway that induces testicular development, or the expression of the R-spondin1 (RSPO1)/beta-catenin pathway that regulates ovarian differentiation [1]. Indeed in humans and mice, male sex determination is initiated by the expression of the Y-linked gene *SRY* [2,3,4]. *Sry* expression in turn activates the transcriptional regulator *SOX9* [5]. Subsequently, *SOX9* initiates Sertoli cell differentiation, the supporting cell of the testicular sex cords [6,7]. Signaling pathways initiated in these cells contribute to the organization of the XY gonads [8], as well as to the differentiation of other testicular cell lineages such as the Leydig steroidogenic cells [9,10] and the pro-spermatogonia [11,12], ultimately leading to testis formation and, in turn, male development. In 46,XY patients, loss-of-function mutations in *SRY* and *SOX9* promote male-to-female sex reversal [13,14], whereas translocations of the *SRY* locus to another chromosome

can yield 46,XX patients with female-to-male sex reversal [3]. Loss-of-function mutations [5,7,15,16] and gain-of-function mutations [4,17,18] of *Sry* and *Sox9* have been generated in mouse models, showing that *Sry* and *Sox9* are necessary and sufficient to induce testis differentiation and the associated male development. As a consequence, these genes have been considered as the master inducers of testis differentiation and male development.

In the absence of *SRY* (XX individuals), up-regulation of RSPO1, an activator of the WNT/beta-catenin signaling pathway, promotes ovarian differentiation. Mutations in *RSPO1* are responsible for skin disorders and female-to-male sex reversal in 46,XX patients [19]. Similarly, ablation of *Rspo1* in mice yields female-to-male sex reversal and promotes *Sox9* up-regulation correlated with differentiation of Sertoli cells and formation of testis cords at birth [20]. This gonadal dysgenesis yields development of an ovotestis, a gonad displaying both testicular and ovarian regions [20,21]. *Rspo1* expression in turn activates expression of *Wnt6* [21], another activator of the WNT/beta-catenin signaling pathway involved in ovarian differentiation [22,23]. When the canonical beta-catenin signaling pathway is activated in XY gonads, this induces male-to-female sex reversal

Author Summary

Mammalian sex determination is controlled by the paternal transmission of the Y-linked gene, *SRY*. Using mouse models, it has been shown that the main, if not the only, role of *Sry* is to activate the transcription factor *Sox9*, and these two genes are necessary and sufficient to allow male development. Indeed, defects in *Sry* and/or *Sox9* expression result in male-to-female sex reversal of XY individuals. In XX individuals, *Rspo1* is important for ovarian development as evidenced by female-to-male sex reversal of XX *Rspo1* mutants. Since testicular differentiation appears concomitantly with *Sox9* expression, it was assumed that *Sox9* is the inducer of testicular differentiation in XX *Rspo1* mutants. Our genetic study shows that i) neither *Sry* nor *Sox9* are required for female-to-male sex reversals; ii) other masculinizing factors like *Sox8* and *Sox10* are activated in sex reversal conditions; iii) *Rspo1* is the main effector of male-to-female sex reversal in the XY *Sox9* mutants. Together these data suggest that male and female genetic pathways are both main effectors involved in sex determination and that the long-standing dogma of a default female pathway should definitively be revised.

indicating that this pathway acts on top of ovarian differentiation [23]. Indeed, activation of WNT/beta-catenin is required for expression of *Sox2* [24], a transcription factor involved in folliculogenesis [25,26] and homeostasis of the ovary [27]. Thus *Rspo1* appears to be the gene instructing the molecular network leading to ovarian development.

Since ablation of *Rspo1* promotes SOX9 expression concomitantly with Sertoli cell differentiation [20], it was assumed that *Sox9* is the sex reversal inducer in XX *Rspo1*^{fl/fl} mutants. We now show that a) testicular differentiation occurs in XX *Rspo1*^{fl/fl} *Sox9*^{fl/fl} mutants indicating that neither *Sry* nor *Sox9* are required for female-to-male sex reversals; b) testicular differentiation also occurs in XY *Rspo1*^{fl/fl} *Sox9*^{fl/fl} mutants indicating that *Rspo1* is required for male-to-female sex reversal in XY *Sox9*^{fl/fl} mutants.

Results/Discussion

Rspo1 is required for ovarian development in XY *Sox9*^{fl/fl} mice

Sox9 is required for Sertoli cell differentiation, testis formation and male development. Indeed, deletion of *Sox9* in XY *Sox9*^{fl/fl}; *β2-microglobulin*^{Cre}, referred to as XY *Sox9*^{fl/fl}, triggers male-to-female sex reversal [16]. However the factor(s) inducing sex reversal in XY *Sox9*^{fl/fl} remained to be identified. Given (i) the prominent role of BMP1, an activator of beta-catenin signaling, in female sex determination [19], and (ii) the fact that ectopic activation of beta-catenin in XY gonads can induce male-to-female sex reversal [23], we hypothesized that *Rspo1* expression induced male-to-female sex-reversal in XY *Sox9*^{fl/fl} gonads. According to this scenario, neither testicular (which is *Sox9*-dependent) nor ovarian (which is *Rspo1*/beta-catenin-dependent) differentiation should occur in XY *Sox9*^{fl/fl} gonads additionally lacking *Rspo1*. To test this hypothesis, we have generated and analyzed double loss-of-function mice (i.e. XY *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl}; *β2-microglobulin*^{Cre}, referred to as XY *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl}).

Since previous results have shown that sex reversal can appear quite late during fetal development [20,22], we first analyzed adult stages when the sexual development is likely to be completed. At P60 (postnatal day 60), the anogenital distance in XY *Rspo1*^{fl/fl};

Sox9^{fl/fl} mice was equivalent to that of XX controls but the internal genitalia contained both male and female organs including epididymis, uterine horns and vaginal tissues, as well as epididymides, vas deferens, seminal vesicles and prostate (Figure S1). The XY *Sox9*^{fl/fl} developed as ovaries (Figure 1b, lg, ll, 1q and Figure S1), as expected from a previous report [16]. Interestingly, XY *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl} gonads developed as hypoplastic testes containing well-defined seminiferous tubules as evidenced by histological analysis (Figure 1c, 1h and Figure S1). We next examined whether the supporting cells forming the seminiferous tubules differentiated as granulosa cells, the ovarian supporting cells expressing FOXL2 [25,28] or as Sertoli cells expressing DMRT1 [29]. In P21 gonads, immunostaining experiments showed that the supporting cells forming the seminiferous tubules in XY *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl} gonads were DMRT1-expressing Sertoli cells (Figure 1e), even though SOX9 was clearly missing (Figure 1m). However, a few FOXL2-positive granulosa cells were found within the alignment of the Sertoli cells forming the seminiferous tubules (Figure 1n, o) and in a few XY *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl} mice (3 out of 18), one and abnormal follicles were observed (Figure S2A). The mixed genetic background of *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl} mice is a likely factor causing the variation of this phenotype.

Altogether this shows that a genetic pathway actuated by *Rspo1* is required for the male-to-female sex-reversal of XY *Sox9*^{fl/fl} and indicates that Sertoli cell differentiation and seminiferous tubules formation can occur in the absence of SOX9.

Sertoli cell differentiation occurs without Sry and Sox9 in XX *Rspo1*^{fl/fl} gonads

Our study also allowed us to evaluate the effect of *Sox9* removal in a female-to-male sex reversal context (i.e. in XX *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl}). Given that homozygous mutations of *Rspo1* promote Sertoli cell differentiation around birth, a process that is associated with *Sox9* up-regulation in these cells [20], we hypothesized that *Sox9* is the inducing factor of testicular differentiation in XX *Rspo1*^{fl/fl} mice. If *Sox9* is indeed the main switch for female-to-male sex reversal in XX individuals, one expects an impaired differentiation of Sertoli cell and seminiferous tubules in the absence of both *Rspo1* and *Sox9* in XX *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl} gonads. Unexpectedly, at P60, these XX double mutants displayed hermaphroditism of the reproductive tracts (Figure S1). Histological analysis revealed that XX *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl} mice exhibited ovarioles with an extensive presence of sex cords (Figure 1d, 1i and in Figure S2B, S) as do XX *Rspo1*^{fl/fl} gonads (shown in Figure S2B, S2c and in previous analyses [20,21]). Thus, the development of XX *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl} mouse genitalia is indistinguishable from that of XX *Rspo1*^{fl/fl} gonads. We next examined whether the supporting cells forming the sex cords differentiated as granulosa cells, the ovarian supporting cells expressing FOXL2 [25,28], or as Sertoli cells expressing DMRT1 [29]. In three weeks old mice (P21), *Sox9*-depleted cells forming the seminiferous tubules generally lacked the follicular cell marker FOXL2 and instead expressed DMRT1 (Figure 1n, 1g). These data clearly indicate that Sertoli cell, seminiferous tubule and testis differentiation can occur in the absence of *Sry* and *Sox9* in XX *Rspo1*^{fl/fl} gonads.

Steroidogenic cells are present in *Rspo1*^{fl/fl}; *Sox9*^{fl/fl} embryonic gonads

Previous studies clearly show that the development of male genitalia depends on androgens secreted by the embryonic testis

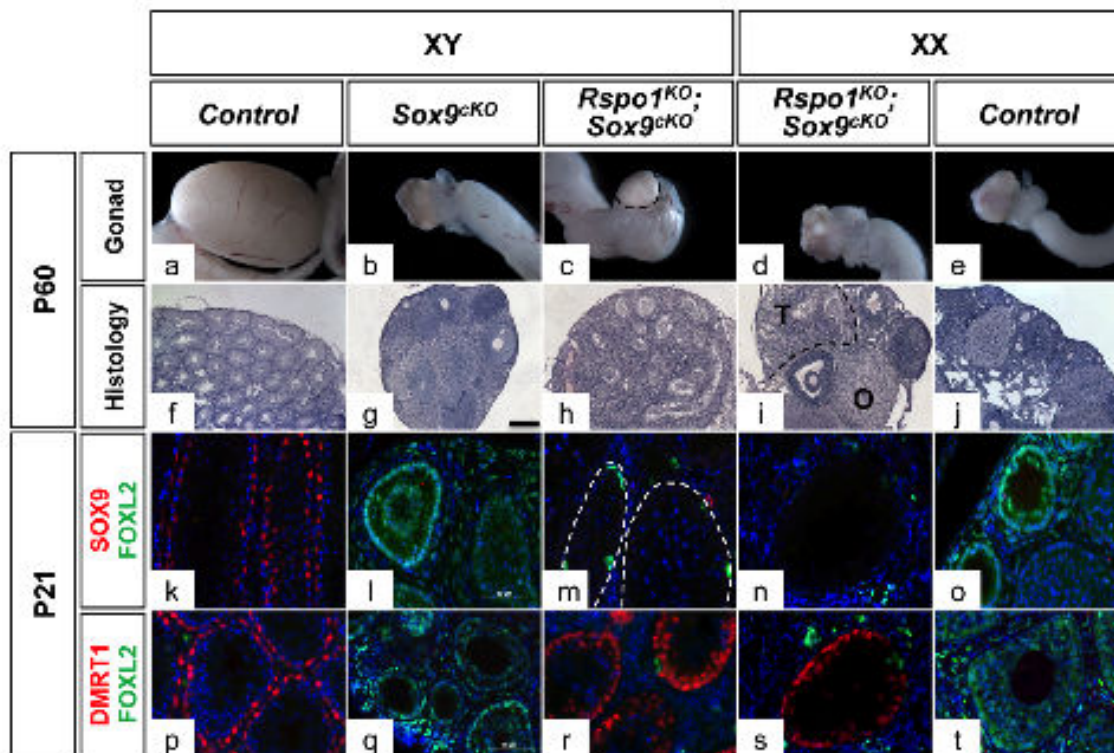


Figure 1. Testicular differentiation in XY and XX *Rspo1*^{-/-}; *Sox9*^{cKO}; *Sf1xrc*^{-/-} (*Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO}) mice. Macroscopic views of gonads of 2 month-old mice show hypoplastic testis and ovaries development in XY (b) and XX (d) *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} mice, respectively. Serriferous tubules are revealed by PAS histological analysis of XY (h) and XX (j) *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonadal sections. They are less abundant than in XY controls (f). XY *Sox9*^{cKO} gonads (g) develop as ovaries (O). (T: testicular region, O: ovarian region, scale bar: 200 μm). Immunofluorescence of SOX9 (k-o) or DMRT1 (p-t) in Sertoli cell marker, in red, FOXL2 (k-e) in follicular cell marker, in green, and DAPI in nuclear marker in blue (scale bar, 50 μm). Deletion of *Sox9* with *Sf1xrc* (*Sox9*^{cKO}) eliminates SOX9 expression in Sertoli cells (l, m, n), and promotes male-to-female sex reversal in XY *Sox9*^{cKO} gonads as highlighted by robust FOXL2 expression (k, q). However, *Sox9* deletion no longer allows ovarian cells differentiation when *Rspo1* is deleted in the XY (n, o) and XX (s, t) *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} mice. This is evidenced by the robust expression of DMRT1 in 3 week-old XY (h) and XX (j) mutant gonads and XY controls (g), and the low or absent expression of FOXL2 in these gonads (k, m, n, p, r, s). XY (k, l, k, p) and XX (s, t, s, t) *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} controls, XY *Sox9*^{cKO} gonads (k, g, l, q), XY (c, h, m, r) and XX (d, l, n, s) *Sox9*^{cKO} *Rspo1*^{KO} respectively, XX *Rspo1*^{KO} and XX *Sox9*^{cKO} *Rspo1*^{KO} gonads appeared similar (see Figure S2B). doi:10.1371/journal.pgen.1008170.g001

[30]. In XX *Rspo1*^{KO} gonads, steroidogenic cells appear before Sertoli cell differentiation [20,31] and this was also observed in *Wnt4*^{KO} gonads [22,32], *Wnt4* being up-regulated upon *Rspo1* expression in XX gonads [20,21]. In addition, lack of *Wnt4* expression was shown to allow ectopic migration of steroidogenic cells from the neighboring adrenals into gonads [32,33] and subsequent androgen synthesis [34], which explains the development of male genitalia in these mutants. When investigating whether steroidogenic cells were present in XX and XY *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads, we found that *P450scc*, a gene encoding for a precursor involved in androgen synthesis was expressed at 14.5 dpc in XY controls, XY and XX *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads and XX *Rspo1*^{KO} gonads, but not in XX controls (Figure S3A). However, *Cyp11*, a marker for adrenal cells [35], was not strongly expressed in *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads at 13.5 dpc (Figure S3A), suggesting that the steroidogenic cells in *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads, did not come from the adrenals or, alternatively, have undergone reprogramming as Leydig cells. Whatever the situation, it is likely that male hormones synthesized in the developing mutant gonads can contribute to stimulate epididymides, vas deferens and seminal vesicles development.

Delayed testicular formation in *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} mice

We next investigated the timing of testicular cord formation in XY and XX *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads. In wild-type embryos, the earliest morphological sign of testis development occurs at 12.0–12.5 dpc when testis cords are formed [36]. Accordingly at 13.5 dpc, the testis cords were highlighted in XY controls by the prominent expression of SOX9 and AMH, two markers of Sertoli cells (Figure 2a). In contrast, *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads did not show a clear testicular organization as they lack AMH at 13.5 dpc (Figure 2b, 2c, 2f, 2g). As AMH synthesis and secretion by Sertoli cells promotes the elimination of the female reproductive tract during embryogenesis [37], the absence of AMH in *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads provides an explanation for the maintenance of the Mullerian derivatives (oviducts, uterine horns and vaginal tissue) in these mutant mice. In addition, Sertoli cell differentiation is delayed in gonads lacking both *Sox9* and *Rspo1*, as indicated by the maintenance of SRY expression, in the XY *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads at 13.5 dpc (Figure 2b), a stage at which SRY expression has already ceased for one day in the control situation [38,39,40]. Along these lines, the maintenance of SF1 expression in XX *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} gonads at 13.5 dpc (Figure 2j, 2k), a factor whose

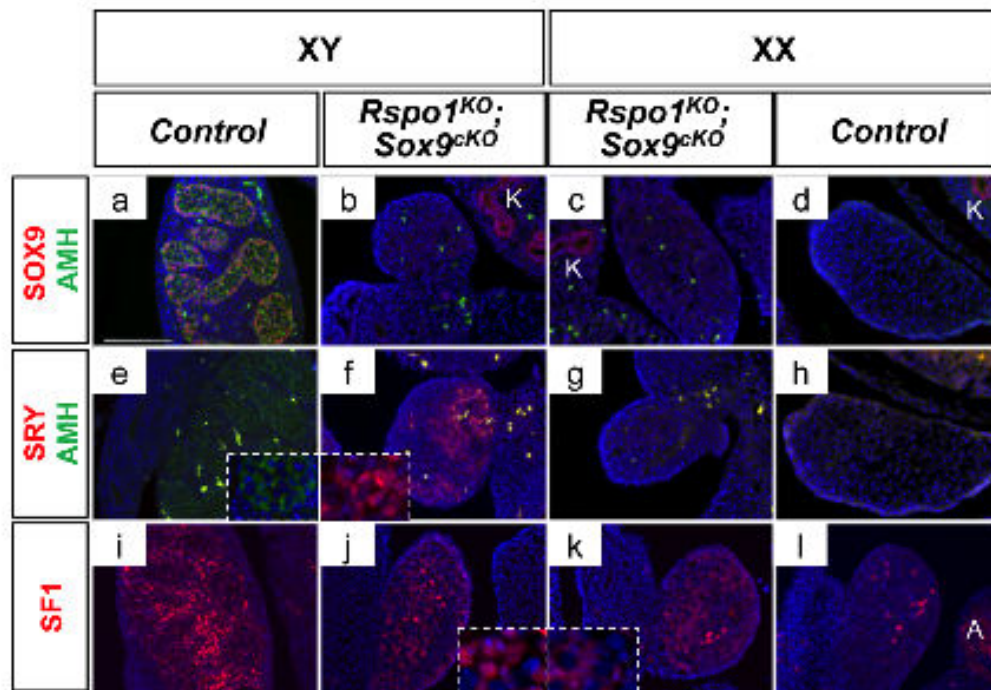


Figure 2. Non-differentiated XY and XX *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads at 13.5 dpc. Immunofluorescence of SOX9 (Sertoli cell marker, in red) and AMH (Sertoli cell marker, in green) and SRY (pre-Sertoli and Sertoli cell marker in red) (a–h) and SF1 (undifferentiated supporting cell, Sertoli and Leydig cell marker) (i–l). Counterstain is DAPI (in blue). Lack of SOX9 and AMH expression in XY (b) and XX (c) *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads shows that Sertoli cell differentiation did not occur at 13.5 dpc. Note that the kidneys (K) are positive for SOX9. This is accompanied with the maintenance of SRY expression in the XY *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads (f) whereas SRY expression has ceased in XY controls (e). SF1 expression is maintained in absence of Sertoli cells differentiation in XY and XX *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads (j and k respectively) (scale bar: 100 μm). Note that SF1 is also expressed in steroidogenic cells of the adrenals (A), XY (i, e, j) and XX (d, h, k) *Rspo1*^{KO}; *Sox9*^{cKO} controls, XY (i, e, j) and XX (d, h, k) *Sox9*^{cKO} *Rspo1*^{KO} respectively. doi:10.1371/journal.pgen.1003170.g002

expression is normally down-regulated between 13.5 and 16.5 dpc in the ovary [41] (Figure 2), also suggests that the XX *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads are still undifferentiated or have differentiated as testis. However, with respect to the latter, the absence of AMH expression shows that no Sertoli cell differentiation has occurred (Figure 2e, 2g). Altogether these data indicate that the *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads are still undifferentiated at 13.5 dpc.

The first signs of Sertoli cell differentiation appeared at 16.5 dpc in *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads, with some rare DMRT1-positive cells in comparison to XY controls (Figure S3B). Then, few rudimentary testis cords were observed around 17.5 dpc (Figure S3B). At P0, Sertoli cells aligned to form sex cords as evidenced by the localization of DMRT1 positive-cells (Figure S4A c, d). Quantitative PCR experiments further confirmed that *Dmrt1* expression was strongly expressed in XY *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads and weakly in XX *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads at P0, highlighting that more Sertoli cells were present in XY *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads in comparison to XX *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads (Figure S4C). In addition, some FOXL2-positive cells were also detected in *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads (Figure S4A c, d). However, quantitative PCR experiments showed that *Foxl2* expression was significantly reduced in comparison to XX control or XY *Sox9*^{cKO} gonads (Figure S4B) as expected for a gonad developing as ovotestis or testis.

We then studied *SDMB3* expression, a cytoplasmic marker of Sertoli cells and of granulosa cells when follicles form (Best et al. 2008). Using this marker, sex cords were evident at P0 (Figure 3e,

3d and Figure S5c, S5d) and, at puberty (P12), development of the seminiferous tubules appeared complete in *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads (Figure 3h, 3i and Figure S5h, S5i). At puberty, androgen receptor (AR) immunostaining indicated that, in addition to Sertoli cells, peritubular myoid and Leydig cells were also present both in XY *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} testes (Figure 4e) and in testicular parts of the XX *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} ovotestes (data not shown). In addition, follicle development appeared at P12 in XX *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} ovotestes and XX control ovaries (Figure S2B d, f). Together our results indicate that seminiferous tubule development is delayed in the absence of *Sox9* and *Rspo1*, thereby explaining the small size of the XY *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} testes (Figure 1c).

SOX9-negative Sertoli cells can support germ cell differentiation until initiation of meiosis

We next investigated whether the Sertoli cells that differentiate in the *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads can support germ cell differentiation. Since XX germ cells cannot survive in a testicular environment [42,43], the analysis was only carried out in XY *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO} gonads. In the normal fetal testis, following Sertoli cell differentiation, prospermatogonia become quiescent from 14.5 dpc and express the multipotency marker *Oct6* until 17.5 dpc [44]. At that time, *Cpa2201*, a protein involved in retinoic acid degradation, contributes to prevent germ cells from entering meiosis [45,46]. As expected, the majority of prospermatogonia in XY *Rspo1*^{KO}*Sox9*^{cKO}

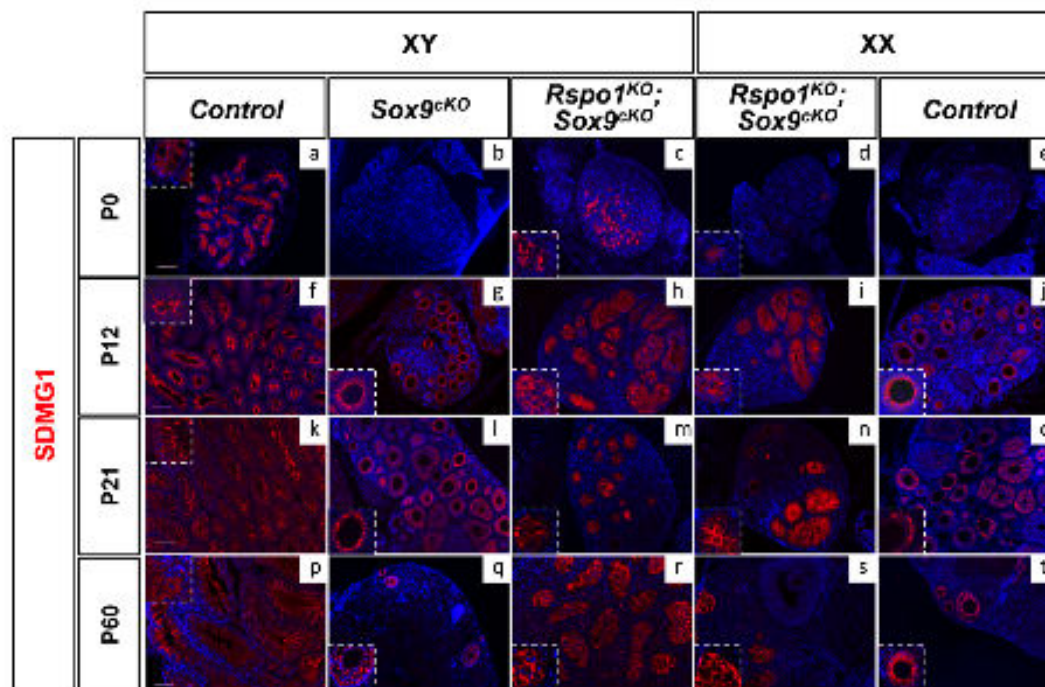


Figure 8. Post-natal development of sex cords in XY and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} mice. Immunofluorescence of SDMG1 (in red). Counterstain is in DAPI (in blue). SDMG1 is expressed in Sertoli cells (XY controls a, f, k, p) and in follicular cells of growing ovaries as evidenced at P12 onwards (e, j). Sertoli cells are present and formed sex cords in both XY and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads, with more developing sex cords in XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} testis (c, h, m, r) in comparison to XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} ovaries (d, i, n, t). At P12, the sex cords are fully developed in both XY (h) and XX (i) *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} mice. In XY *Sox9*^{cKO} (b, g, l, q) and XX control (e, j, o, s) gonads, ovarian follicles express SDMG1 at P12, P21 and P60. At these stages, SDMG1 is also expressed in the follicles of the XX double mutant ovaries (see r) and in XY double mutant follicles when they develop (scale bars: 100 μm). XY (a, f, k, p) and XX (e, j, o, s) *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} controls, XY *Sox9*^{cKO} gonads (b, g, l, q), XY (c, h, m, r) and XX (d, i, n, t) *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads respectively. doi:10.1371/journal.pgen.1000170.g008

gonads expressed *Osf1* at 14.5 dpc (Figure S6c). Nonetheless, some cells had already committed to meiosis (Figure S6d) and expressed the meiotic marker *Srsf* [67], possibly because of the low level of *Cyp20b1* expression in XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads (Figure S6g). The reduced level of *Cyp20b1* expression is however not sufficient to allow all germ cells to enter meiosis in XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads.

At P10, GATA1, Androgen Receptors (AR) and Cholesterol (*Ch*) were normally expressed in Sertoli cells of XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads (Figure 4c, 4i, 4j), suggesting that these cells have acquired their identity and may be capable to support spermatogenesis. Accordingly, XY germ cells had committed to meiosis at P10, as assessed by immunodetection of the pre-meiotic and meiotic markers STRA8 and *HERAK*, respectively (Figure 4c, 4i, 4j). However, later stages of spermatogenesis cannot however be analysed, as hypoplasia of germ cells occurred within the seminiferous tubules of adult XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads (Figure 1h and Figure S1m), most likely because of cryptorchidism.

Sox8 and *Sox10* are expressed in the absence of *Sox9*

Interestingly, we found that AMH was expressed in Sertoli cells of both XX and XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads at P12 (Figure 5A). Given that (i) *Ash* is a target-gene of SOX9 [48,49], (ii) *Ash* expression can be induced by SOXB [50] and SOX10 [51], and (iii) *Sox10* ectopic up-regulation in XX gonads can induce testis

differentiation [51], we hypothesized that a *Sox* factor distinct from *Sox9* could have induced late AMH expression in *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads and delayed testicular differentiation. In agreement with this possibility, expression of both *Sox8* and *Sox10* was activated in *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} mutants at P12 and P0 respectively (Figure 5B, 5C). Previous data have shown that *Sox8* becomes crucial from 14.5 dpc onwards, for the maintenance of testis development [52], suggesting that Sertoli cell differentiation can be induced by *Sox* genes other than *Sox9* during late embryogenesis. However, the function of these *Sox* genes during late development is likely not sufficient to replace the role of *Sox9* in early Sertoli cells development, thus leading to the formation of an hypoplastic testis, as is the case in the XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} mice. To date, the only factors that have been shown to be able to induce Sertoli cell differentiation are *Sox* genes [51,53], while other factors such as *Dmrt1* are required after birth (P7) for the maintenance of Sertoli cell identity [54]. Further studies are required to address whether *Dmrt1* is able to allow Sertoli cell differentiation from undifferentiated supporting cells. Given that *Sox9* expression is controlled by *Wnt* when *Sry* expression has ceased [55], we can speculate that *Wnt* might also be involved in *Sox8* and *Sox10* expression in these mutants. Furthermore, *FGF9* or *FGD2*, two secreted factors synthesized in the undifferentiated gonads, [56,57] can also contribute to Sertoli cell differentiation [58,59,60]. Whether *Wnt*, *FGD2* or *FGF9* signaling also regulate *Sox8* and *Sox10* remains to be investigated.

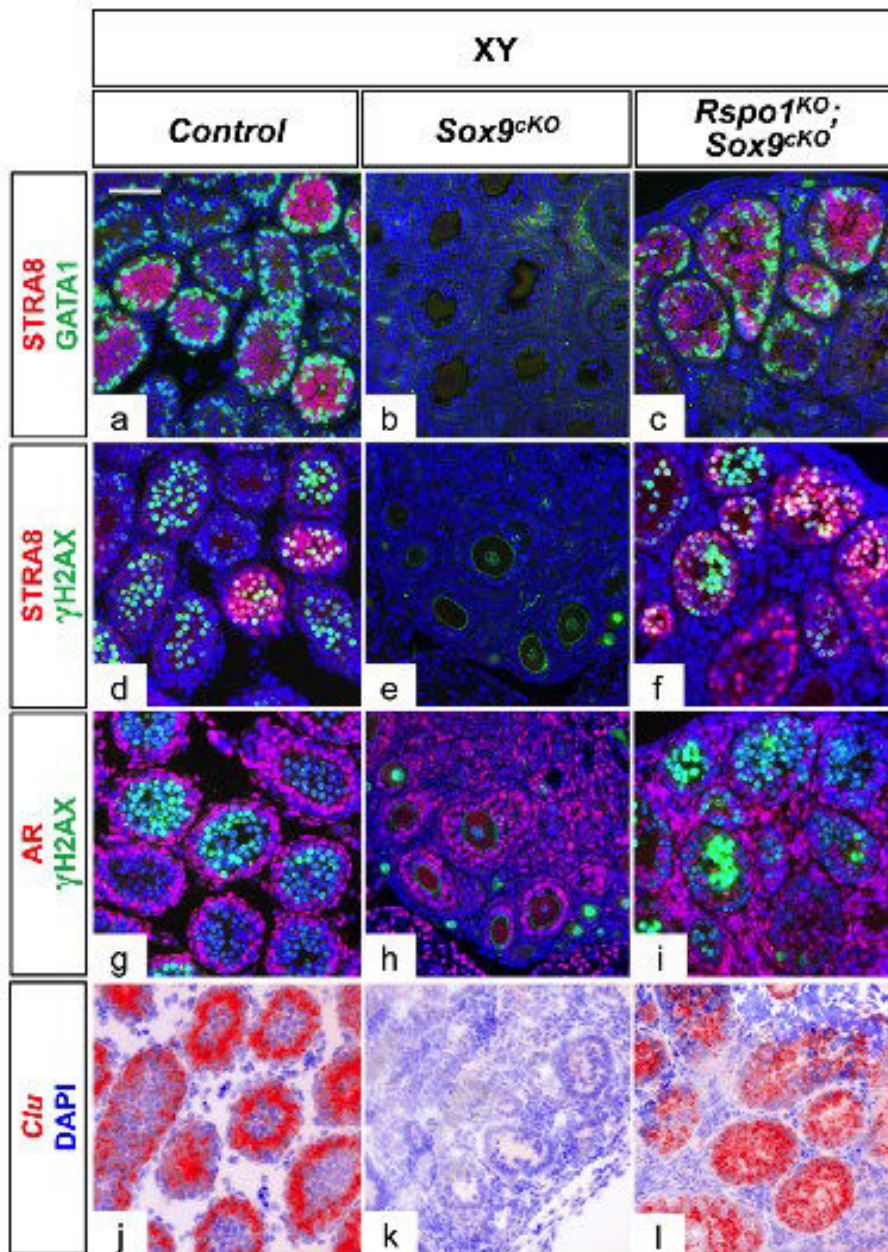


Figure 4. Sertoli cells support germ cell differentiation in XY *Rspo1^{KO}Sox9^{CKO}* gonads. Immunofluorescence (a–i) of GATA1 (Sertoli cell marker, in green), AR (Androgen Receptor) (Sertoli, peritubular myoid and Leydig cell marker, in red), STRAB (a spermatogenic marker, in red), and γ H2AX (a mitotic marker, in green) at P10. Counterstain is DAPI (in blue). In situ hybridization (j–l) using a probe for *Ctlu* transcripts, another marker for mature Sertoli cells, illustrated as computer-generated bright field superimpositions of the blue counterstain (DAPI) with the hybridization signal (red false color). GATA1, AR and *Ctlu* expression show that the Sertoli cells mature in XY controls (a, g, j) and XY *Rspo1^{KO}Sox9^{CKO}* testes (c, i, l), and are able to support germ cell differentiation and meiosis initiation as revealed by STRAB (a, c, d, f) and γ H2AX (d, f, g, i) expression. Note that both Sertoli, peritubular myoid and Leydig cells of XY *Sox9^{CKO}* mutant gonads normally expressed AR (h). (scale bars: 50 μ m). XY (a, d, g, j) *Rspo1^{KO}Sox9^{CKO}* controls, XY *Sox9^{CKO}* gonads (b, e, h, k) and XY *Rspo1^{KO}Sox9^{CKO}* (c, f, i, l) gonads. doi:10.1371/journal.pgen.1003170.g004

In addition, when XX and XY *Rspo1^{KO}Sox9^{CKO}* gonads are compared at the same stage, XY gonads always appear more masculinized than XX gonads (Figure 1, Figure 5, Figure S1, Figure S3, Figure S5), because

they contain more sex cords/semicrow tubules. At a molecular level, the main difference between XX and XY *Rspo1^{KO}Sox9^{CKO}* gonads is the expression of *SRY* in XY gonads (Figure 2). Indeed, *SRY* expression is

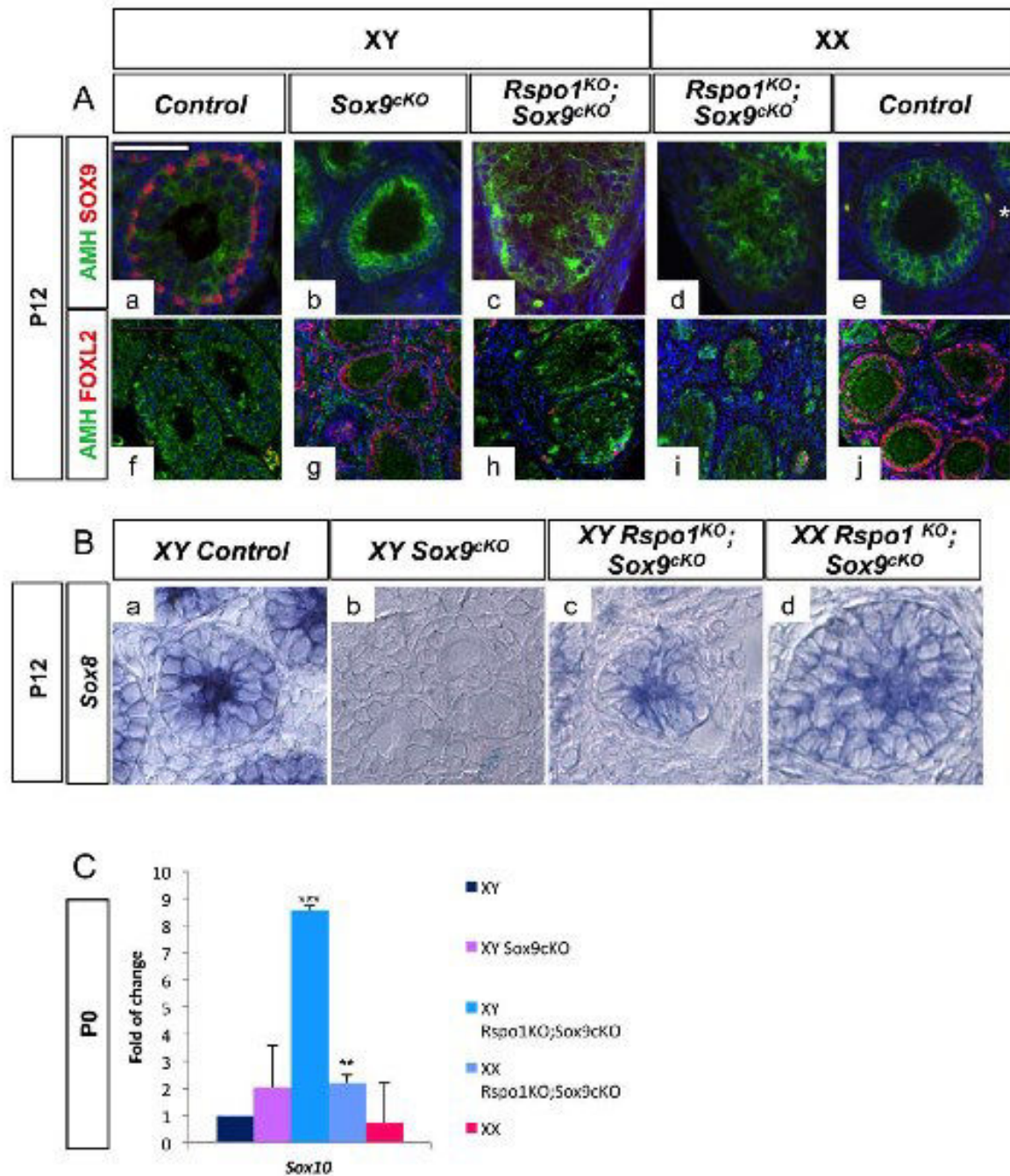


Figure 5. AMH and SOX9 genes are expressed in XY and XX *Rspo1^{KO} Sox9^{cKO}* gonads. A—AMH expression in absence of SOX9. Immunofluorescence of SOX9 (in red) and AMH (in green). Counterstain is DAPI (in blue). SOX9 and AMH are synthesized in Sertoli cells of the testis (a, b). SOX9 is expressed in theca cells (white star in a) and AMH is follicular cells of the ovary at P12 (a, j). Deletion of *Sox9* with *Sfl:cre* eliminates SOX9 expression in *Sfl:cre* positive cells of the gonads, which are Sertoli cells in XY (c) and XX (d) *Rspo1^{KO} Sox9^{cKO}* gonads and theca cells of the ovarian region of XX *Rspo1^{KO} Sox9^{cKO}* gonads (e) and XY *Sox9^{cKO}* gonads (f). AMH expression is observed in Sertoli cells of the XY (c, h) and XX (d, g) *Rspo1^{KO} Sox9^{cKO}* gonads even the absence of SOX9. (scale bar: 50 μ m). Immunofluorescence of FOXL2 (in red) and AMH (in green). Counterstain is DAPI (in blue). Most of the AMH positive cells in the testicular cords of *Rspo1^{KO} Sox9^{cKO}* gonads (h, i) are negative for FOXL2 indicating that they are not granulosa cells, some AMH/FOXL2 positive cells were observed outside of these cords indicating that they are granulosa cells (h, i). (scale bar: 100 μ m). XY (a, b) and XX (j, k) *Rspo1^{KO} Sox9^{cKO}* controls, XY *Sox9^{cKO}* gonads (b, g), XY (c, h) and XX (d, i) *Rspo1^{KO} Sox9^{cKO}* gonads respectively. B—*Sox8* is expressed in XY and XX *Rspo1^{KO} Sox9^{cKO}* gonads. In situ hybridization of *Sox8* transcripts. *Sox8* is expressed in Sertoli cells at P5 in XY control

6d, XY (c) and XX (d) *Rspo1^{fl/fl}Sox9^{fl/fl}* gonads, but not in XY *Sox9^{fl/fl}* ovaries (e). 6f) XY *Rspo1^{fl/fl}; Sox9^{fl/fl}* controls, 6g) XY *Sox9^{fl/fl}* gonads, XY (c) and XX (d) *Rspo1^{fl/fl} Sox9^{fl/fl}* gonads respectively. C- *Sox10* is expressed in XY and XX *Rspo1^{fl/fl} Sox9^{fl/fl}* gonads. qPCR analysis shows that *Sox10* is significantly up-regulated both in XY and XX *Rspo1^{fl/fl} Sox9^{fl/fl}* gonads, when compared to XY controls. The differences between XY controls and XY *Sox9^{fl/fl}* are not significant. doi:10.1371/journal.pgen.1003170.g005

maintained in XY *Rspo1^{fl/fl}Sox9^{fl/fl}* gonads at 13.5 dpa, while at this time point its expression has ceased in XY control gonads. This suggests that SRY participates in the masculinisation of the XY *Rspo1^{fl/fl}Sox9^{fl/fl}* gonads by inducing the expression of genes other than *Sox9* to promote sex cord formation.

In summary, here we have shown that (i) both SRY and SOX9 are dispensable for female-to-male sex reversal in *Rspo1^{fl/fl}*, (ii) BMP2/1 signaling is required for male-to-female sex reversal in *Sox9^{fl/fl}*, (iii) Sertoli cell differentiation and seminiferous tubule formation can occur in the absence of SOX9, possibly because of a functional redundancy with other SOX proteins such as SOX8 and SOX10. Indeed, ectopic expression of *Sox9* in XX gonads has been shown to promote testicular differentiation [51]. Altogether these data show that SRY and SOX9 are not the only masculinising factors, since other SOX proteins can induce female-to-male sex reversal in pathophysiological conditions (Figure 3). Following Sertoli cell differentiation, DMRT1 expression becomes required for the maintenance of the Sertoli cells and the testicular tissue [54]. Furthermore, our data suggest that the feminising factors remaining in *Rspo1^{fl/fl}* mice can be overtaken by SOX proteins, when they are activated in XX gonads. Testicular differentiation in the absence of *Rspo1* expression in XY *Sox9^{fl/fl}* gonads was unexpected since female development is thought to be a default pathway [51,52]. Our results imply that instead the female pathway needs to be activated. Therefore our genetic study suggests that mammalian sex determination is regulated by a finely tuned balance between two main factors [56,58], which are the SOX genes on the one hand and the BMP2/1/WNT1/beta-catenin signaling pathway on the other hand.

Materials and Methods

Mouse strains and genotyping

The experiments here described were carried out in compliance with the relevant institutional and French animal welfare laws, guidelines and policies. They have been approved by the French ethics committee (Comité Institutionnel d'Éthique Pour l'Animal de Laboratoire; number N°CE/2011-12). All mouse lines were kept on a mixed 129Sv/057BL6/J background. *Rspo1^{fl/fl}*, *Sox9^{fl/fl}* mice and *Sry^{Cre}* transgenic mice (a kind gift from Keith Parker) were described previously [54]. *Rspo1^{fl/fl}* male were mated with *Sox9^{fl/fl}*; *Sry^{Cre}* female [16] to obtain *Rspo1^{fl/fl}; Sox9^{fl/fl}*; *Sry^{Cre}* females and *Rspo1^{fl/fl}; Sox9^{fl/fl}* males. Matings between these littermates allowed us to generate *Rspo1^{fl/fl}; Sox9^{fl/fl}*; *Sry^{Cre}* mice, referred to as *Rspo1^{fl/fl} Sox9^{fl/fl}* mice, and controls. Gonad samples were collected from timed pups (day of birth = P0). Genotyping was performed as described [7,20,64] using DNA extracted from tail tip or ear biopsies of mice. The presence of the Y chromosome was determined as described previously [65]. *Pou5f1* primer set (5'-GCAACAGGAAGGAGGGGGCAG-3'; 5'-GTTTCCTCAGAGCCTCAATCTC-3') was included in each PCR reaction as an internal control.

Histological analysis

Urogenital organs were dissected, fixed in Bouin's solution overnight, and then embedded in paraffin. Microtome sections of 5 μ m thickness were stained with periodic acid Schiff (PAS) or hematoxylin and eosin (H&E) according to standard procedures. Pictures were taken with an Axiovert microscope (Zeiss) and processed with Adobe Photoshop.

Immunological analyses

Gonad samples were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde overnight and then processed for paraffin embedding. Gonad samples for cryosections were successively fixed for 2 hours in 4% (w/v) paraformaldehyde, washed in cold phosphate-buffered saline (PBS), equilibrated in 10% (w/v) sucrose solution during 3 hours, then in 30% (w/v) sucrose solution overnight at 4°C, embedded in Cryomount (Histolab) and stored at -80°C. For paraffin-embedded and Cryomount-embedded samples, sections of 5 and 8 μ m thickness were processed, respectively. The following dilutions of primary antibodies were used: AMH/MIH (C-20, sc-6886, Santa Cruz), 1:200; AR (sc-816, Santa Cruz), 1:100; DMRT1 (kindly provided by David Zarkower), 1:500; FOXL2 (ab5096, Abcam), 1:250; HERAK (U5-636, Upstate), 1:500; GATA1 (sc-265, Santa Cruz), 1:50; SOX9 (a kind gift from Ian Adams) 1:200; SRY (kindly provided by Ken Moriwahashi) 1:1500; SOX8 (HPA-001758, Sigma) 1:250 and SRY [59,66] 1:100; STRA8 (ab4902, Abcam), 1:100. Counterstain with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to detect nuclei (in blue). Fluorescent studies were performed with a motorised Axio ImagerZ1 microscope (Zeiss) and pictures were taken with an Axiovert camera (Zeiss) and processed with Axiovision LE.

In situ hybridization

Embryos were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in 1xPBS at 4°C overnight. Further processing of embryos and *in situ* hybridization were carried out essentially as described [67]. *Sox9* riboprobe was synthesised according to [68] and *Sox8* to [69]. *Pou5f1*, *Sry* and *Ostf1* riboprobes synthesis were carried out as described previously [20]. *In situ* hybridisation (ISH) with digoxigenin-labelled probes was performed as described [70], using 10 μ m-thick cryosections. Each experiment was repeated on at least two gonads. Post-hybridisation washes were done in 100 mM maleic acid pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) tween-20 (MAET). To increase the sensitivity, 5% (v/v) polyvinyl alcohol (Sigma) was added to the staining solution [71]. Nuclei were counterstained with DAPI diluted in the mounting medium at 10 μ g/ml (Vectashield, Vector laboratories). ISH signals corresponding to *Cis*-positive cells were converted into a red false color on the merged pictures. The plasmids containing *Lgd1* (366 bp-long; exons 2-4; MGH26777) or *Cis* (942 bp-long; exons 5-9; MGH88425) cDNA fragments were linearised and used as a templates for the synthesis of the sense or antisense riboprobes.

Quantitative PCR analysis

Individual gonads were dissected in PBS from P0 animals (day of birth) and immediately frozen at -80°C. RNA was extracted using the RNeasy QIAGEN kit, and reverse transcribed using the RNA RT-PCR kit (Stratagene). Primers and probes were designed at Roche Assay design center (<http://www.rocheappliedscience.com/sis/rtper/asp/ndc.jsp>). Primers are 5'-TCTCTCTCAGAGCCTTTT-3' and 5'-CCTGGTTTCAATATCGTAATC-3' (probe 95) for *Sry*, and 5'-ATGTCA-GATCGGAAACCCAG-3' and 5'-GTCTTTGGGCTGGTGGAG-3' (probe 21) for *Sox9*, 5'-agagatgcagcctcttgc-3' and 5'-ggggcgtctccctctct-3' (probe 40) for *Dmrt1*, and 5'-

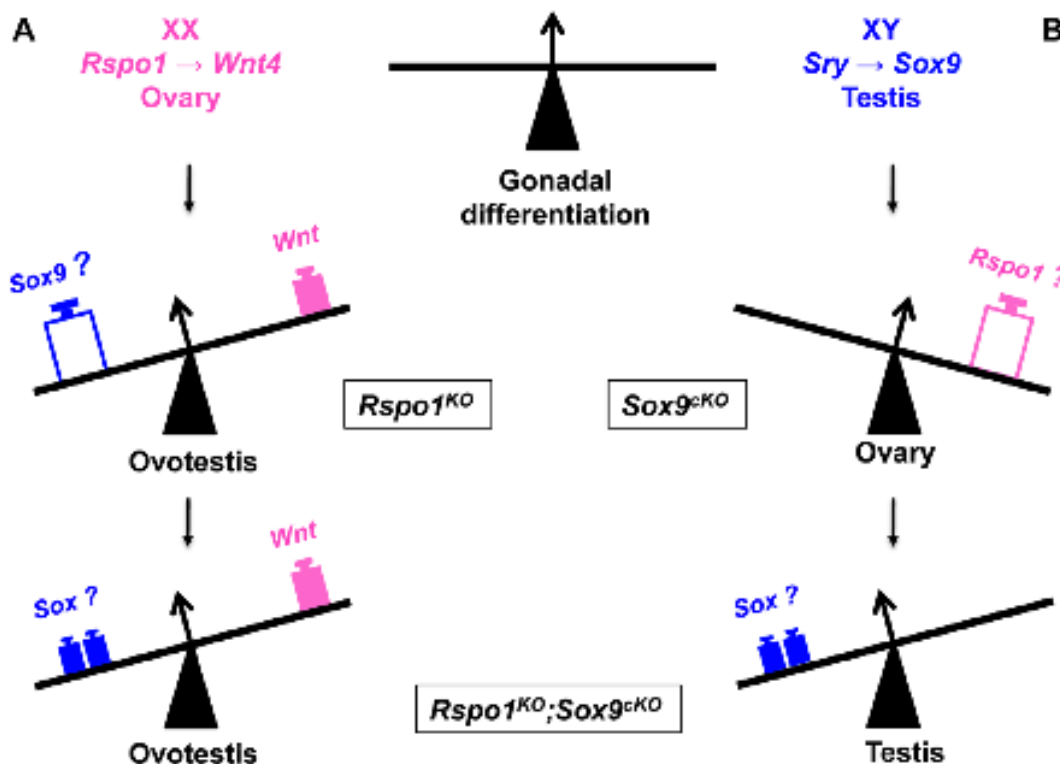


Figure 6. Opposing function of SOX and RSP01 signaling in the fate of the gonad. A- In XX gonads, RSP01 activates WNT/beta-catenin signaling to promote ovarian differentiation. Abolition of *Rspo1* results in partial sex reversal with ovotestic development, which coincides with *Sox9* expression. However additional deletion of *Sox9* in the XX *Rspo1*^{KO} (i.e., *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO}) still allows ovotestis formation, implying that *Sry* and *Sox9* are not required for testicular differentiation in female-to-male sex reversal. B- In XY gonads, whereas *Sox9* deletion triggers ovarian development, additional deletion of *Rspo1* in XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads restores testis development. This is associated with the expression of other SOX genes like SOX 8 and SOX10, other masculinizing factors. doi:10.1371/journal.pgen.1003170.g006

ggctctggactctca-3' and 5'-tgcattgctgctgag-3' (probe 51) for *Rso2*. All real-time, quantitative, PCR assays (QPCR) were carried out using the Qiagen Master kit Roche, according to the manufacturer's instructions. QPCR was performed on cDNA from one gonad and compared to a standard curve. QPCR were repeated at least twice. Relative expression levels of each sample were quantified in the same run, and normalized by measuring the amount of *Rps1* cDNA (which represents the total amount of gonadal cells).

Statistical analysis

For each genotype ($n = 5$ individuals), the fold-change was the mean normalized expression levels divided by the mean normalized expression levels of the XY samples considered as the reference. Graphs illustrate fold-changes ± 1 s.e.m. The results were analysed using Graphpad for statistical significance that was assessed using one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-test for selected pairs of genotypes. Asterisks indicate: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Supporting Information

Figure S1. Testicular differentiation in XY and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} mice. External genitalia of XX control mice (c) is similar to XY *Sox9*^{cKO} (b), XY and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} mice (e and d

respectively) at 2 months of age. The internal genitalia of XY and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} mice (h, i) show epididymides (E), vas deferens (VD) and seminal vesicles (SV), as in XY males (f) but also uterine horns (U) and oviducts (Ov) as in XX controls (g) or XY *Sox9*^{cKO} mice (g). PAS stained histological sections of XY and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads (m, n) show seminiferous tubules lacking germ cells because hypoplasia of germ cells occurred in these tubules. XY *Sox9*^{cKO} gonads (l) are similar to ovaries (o) (scale bar, 50 μ m). XY (e, f, k) and XX (c, j, o) *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} control, XY *Sox9*^{cKO} gonads (b, g, l), XY (c, h, m) and XX (d, i, n) *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads respectively. (TIF)

Figure S2. A- XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonad containing a single follicle. XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonad with a single grossly large follicle was located near the entrance of the oviduct (a). This follicle contained three oocytes and was observed in XY *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads on rare occasions (a). B- Comparison of XX *Rspo1*^{KO} and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads. Immunofluorescence detection of SOX9 in Sertoli cells (cytoplasmic) of XX *Rspo1*^{KO} (b) and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} (c) gonads at P19. Some sex cords are clearly visible in XX *Rspo1*^{KO} and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} in contrast to XX control gonads (a). Histological analysis of XX *Rspo1*^{KO} and XX *Rspo1*^{KO};*Sox9*^{cKO} gonads at P19 and P21 (e, h and f, i respectively) show the presence of seminiferous tubules and follicles in comparison to XX controls containing only follicles

(i, g). Empty and filled arrowheads indicate testis cords and follicles, respectively.

(IIF)

Figure S3 A-Expression of the steroidogenic marker *P450 α* and *Cyp21* in XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads. Whole-mount *in situ* hybridization of gonads at 14.5 dpa and 13.5 dpa. *P450 α* is expressed in XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads (b), and in XY controls (a) but not in XX controls (c). *P450 α* was expressed in cells at the anterior part of the XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* and XX *Rgs1^{+/+}* gonads (c and d respectively) at 14.5 dpa. *Cyp21* was strongly expressed in the adrenals (f, g, h, i, j), whereas no signal was detected in the gonads at 13.5 dpa (f, g, h, i, j). Ad: adrenal; G: gonad; K: kidney. B-Delayed testicular cords formation in XY and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads. Haematoxylin and eosin stained histological sections of XY and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads at 17.5 dpa show that some sex cords are forming in the XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* (b) gonads in contrast to the XY controls (a) containing already formed sex cords. In the littermates XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* and *Rgs1^{+/+}* gonads (c and d respectively), no sex cords were observed at this stage (scale bar, 10 μ m). Insets in a and b show AMH (Red) and DMRT1 (green), two markers of Sertoli cells highlighting sex cords at 16.5 dpa. Sex cords were rare in XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads and absent from XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads at this stage.

(IIF)

Figure S4 Detection of DMRT1 and FOXL2 in XY and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads at P0. A-Immunofluorescence analysis of DMRT1 and FOXL2 in XY and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads at P0. DMRT1 (red), a marker of postnatal Sertoli cells, was detected in the XY control (a), XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads (c and d respectively) while in XY *Sox9^{+/+}* (b) and XX (e) control gonads DMRT1 was not detected. The ovarian protein FOXL2 (green) was detected in XY *Sox9^{+/+}* and XX control gonads, and few FOXL2-positive cells (granulosa cells) were found within the XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* (c) and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* (d) gonads. B-qPCR analysis of *Sox9* in XY and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads at P0. *Sox9* is significantly up-regulated in the XY *Sox9^{+/+}* compared to XY and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* indicating that ablation of *Rgs1* leads to reduced *Sox9* expression at a transcriptional level. C-qPCR analysis of *Dmrt1* in XY and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads at P0. *Dmrt1* is significantly up-regulated in the XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads, indicating that ablation of both *Rgs1* and *Sox9* promotes Sertoli cell differentiation. *Dmrt1* is not up-regulated in XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads. Indeed, at P0 few Sertoli cells have differentiated in XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads in comparison to XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads (see Figure 3). In addition it is noteworthy that *Dmrt1* transcription occurs in the XY *Sox9^{+/+}* but the protein is not detected (see same figure panel A). This suggests that the *Rgs1* signaling pathway antagonizes the male pathway, at least

References

- Dahlke T, Capel B (2006) Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent routes to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 487–502.
- Goldby J, Collipson J, Koopman P, Capel B, Eisenman A, et al. (2006) 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* 340: 365–370.
- Burdick AN, Berta F, Palanca ML, Burdick JR, Griffin RL, et al. (2004) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 540–544.
- Koopman P, Goldby J, Vainio N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (2001) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 409: 117–121.
- Belikov R, Lovell-Badge R (2007) Sex determination involves epigenetic action of *SRY* and *SRY* on a specific *Sox9* enhancer. *Nature* 453: 330–334.
- Burdickova P, Begeret-Pan S, Khandy J, Kim R, Taketo MM, et al. (2006) Heterozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice. *Mol Reprod* 24: 486–494.

partly at the post-conceptual level, as shown for two other genes *Wnt5* and *Rgs9* [56,72].

(IIF)

Figure S5 Histological analysis of XY and XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads at P0, P12 and P21. Differentiation of seminiferous tubules containing germ cells in XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* hypoplastic testis (c, h, m) and XY controls (a, f, k). In XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* (d, i, n), the gonads develop as ovaries containing both seminiferous tubules and follicles (white star indicates a section of a follicle and white arrowhead shows a section (o) of a seminiferous tubule). However, as previously shown [75], the XX germ cells did not survive in post-natal seminiferous cords. In contrast, germ cells survived until P12 and some until P21 in the XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* seminiferous tubules (h and m respectively) (scale bar: 50 μ m). Controls XY (a, f, k) and XX (c, j, o), XY *Sox9^{+/+}* (b, g, l) and XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* (e, h, m), XX *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* (d, i, n).

(IIF)

Figure S6 Mixed germ cell differentiation in XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads at 14.5 dpa. *In situ* hybridization using a riboprobe for *Sox9* (a-d), *Cyp26b1* (e-h), *Sox8* (i-l) and *Osf1* transcripts (m-p) shows lack of *Sox9* expression in the XY *Sox9^{+/+}* (b) XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* (c) and the XX control (d) gonads. Germ cells in XY *Sox9^{+/+}* (f) and XX (g) control gonads have entered meiosis as evidenced by robust *Sox8* expression and weak expression of primordial germ cell marker *Osf1* (n and p respectively). XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* mutants (h) showed *Sox8* expression at the periphery of the E14.5 gonad indicating these few cells have undergone meiosis (h) while the remaining germ cells were quiescent, thus, express *Osf1* (o). Few *Cyp26b1* expressing cells were detected in XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* gonads (e). G: gonad; K: kidney. XY (a, e, i, m) and XX (d, h, l, p) *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}*; *Sox9^{+/+}Sox9^{+/+}* controls, XY *Sox9^{+/+}* (b, f, j, n) and XY *Rgs1^{+/+}Sox9^{+/+}* (c, g, k, o).

(IIF)

Acknowledgments

We would like to thank Richard Behringer and Robin Lovell-Badge for helpful discussions, Ian Adams, Ken Mosebach, Dagmar Wilhelm, and David Zacharow for the SOX9, SRY, FOXL2, and DMRT1 antibodies, respectively, and Stephen Goodfellow, Dagmar Wilhelm, and Peter Koopman for the SRY antibody.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RL A-AC NRG M-CC. Performed the experiments: RL A-AU BP EFG MK MM M-CC. Analyzed the data: RL A-AC EP EFG DGR MM AB NRG M-CC. Wrote the paper: AB NRG M-CC.

13. Berta F, Hagglin JM, Sinclair AH, Taylor A, Goffeys H, et al. (1990) Genetic evidence supporting SRY and the testis-determining factor. *Nature* 346: 449–450.
14. Wagner T, Webb J, Meyer J, Zaleski B, Haldi M, et al. (1999) Antennal sex reversal and compensatory diapause are caused by mutations in and around the *Ubx*-containing gene *SOX9*. *Cell* 98: 1111–1120.
15. Lovell-Badge R, Mahony S (1990) XY female mice resulting from a heritable mutation in the putative testis-determining gene, *Tdy*. *Development* 108: 635–642.
16. Levey S, Lutzbach A, Banno-Jacobson M, Pappas E, Gagnier EE, et al. (2011) XY female embryonic loss-of-function mouse mutants show complete sex reversal and produce partially fertile XY oocytes. *Dev Biol* 349: 111–122.
17. Vidal VP, Chhabraier M, de Rooij DG, Sills A (2001) *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28: 218–219.
18. Bishop CE, Whitworth DJ, Yin Y, Agoulakos AI, Agoulakos III, et al. (2008) A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with domesticated XE sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 40: 498–499.
19. Parrot F, Badi O, Vidal V, Chhabraier M, Delamarie E, et al. (2004) *R-spondin1* is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 36: 1804–1809.
20. Chanut AA, Bann F, Gagnier EE, Pappas-Epstein H, Talbot M, et al. (2008) Activation of beta-catenin signaling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary. *Nat Med* 14: 1267–1277.
21. Tsunashima K, Hoshizaki K, Kuroki H, Sugawara Y, Shi Y, et al. (2008) *R-spondin1* plays an essential role in ovarian development through positively regulating *Wnt-4* signaling. *Nat Med* 14: 1274–1281.
22. Valde A, Hoshizaki M, Kuroki A, Chin N, Mochizuki AP (2008) Female development in mammals is regulated by *Wnt-4* signaling. *Nature* 457: 402–405.
23. Mutsaers DM, DeGroot L, Alves A, Parker KL, Talbot MM, et al. (2008) Regulation of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex reversal. *Nat Med* 14: 2010–2014.
24. Moriguchi H, Sengoku T, Leach L, Therman BC (2008) Ovarian development in mice requires the GATA4-POU transcription complex. *Development* 135: 3731–3739.
25. Schmidt D, O'Neil CE, Anay K, Pohlman S, Gradstein L, et al. (2005) The nuclear winged-helix transcription factor *Frst2* is required for granule cell differentiation and every neurogenesis. *Development* 132: 948–956.
26. Otsunaga CI, Otsuki S, Garcia-Celis JE, Goh M, Ohtsuka T, et al. (2005) *Frst2* is required for commitment to every differentiation. *Nat Med* 11: 2003–2007.
27. Ishikawa H, Ishii S, Anay K, Hara-Kawano T, Sekine H, et al. (2006) Specific sex-repressing of adult ovaries is tested by *FRSXL3* deletion. *Cell* 126: 1130–1142.
28. Uda M, Otsunaga CI, Ohtsuka T, Garcia JE, Dobson M, et al. (2005) *Frst2* disrupts mouse mouse ovarian stem by permissive blockage of *Sox10* development. *Nat Med* 11: 1171–1181.
29. Koyama CE, Murphy MW, O'Neil CE, Hara-Kawano T, Zickler D (2007) *Dand1*, a gene related to *Wnt* and *Sox* regulation, is required for mammalian male differentiation. *Genes Dev* 21: 2267–2280.
30. Joseph A, Yoo H, Hagglin JM (2005) Development and embryogenesis of the *Wntless*/*glypcolin* duct, mouse testis and brain. *Dev Biol* 285: 8–14.
31. Argente A, Chanut AA, Gagnier EE, Romani L, Pappas M, et al. (2011) Loss of *R-spondin1* and *Frst2* switches female-to-male sex reversal in XX mice. *Sex Dev* 5: 804–817.
32. Jupp-Ward K, Hoyle C, Brown J, Dardennes M, Allan G, et al. (2007) Reproductive and embryonic cell migration are regulated by *WNT9b* in the developing mammalian gonad. *Development* 134: 3673–3679.
33. Jupp-Ward K, Dardennes M, Brown A (2009) *Wnt9b* is required for progenitor as well as female gonad development. *Dev Biol* 336: 431–444.
34. Hoshizaki M, Hoshizaki K, Kuroki F, Tamoto R, Vazirani J, et al. (2010) The paralogous *frst2* to *frst1* sex reversal in *Wnt-4*-deficient females involves induced expression of testicular transcription factors and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology* 146: 4016–4023.
35. Val F, Jupp-Ward K, Brown A (2008) Identification of a novel population of *sox9*-positive cells in the mammalian testis. *Dev Biol* 320: 458–466.
36. Nel-Thompson L, Gonzalez G, Miquena H, Haininger RH (2010) Illustrating testis development in the mouse. *J Androl* 31: 5–18.
37. Reibinger RB, Pineda HJ, Cline KL (1994) Mitochondrial-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 78: 419–424.
38. Hagglin JM, Koyama CE (2007) Spatially dynamic expression of *Sox9* in mouse genital ridges. *Dev Dyn* 336: 801–805.
39. Hache A, Ouellet M, Gaudreau F, Lovell-Badge R (1996) Expression of *Sry*, the mouse sex-determining gene. *Development* 121: 1043–1054.
40. Jahn TW, Bowden J, Greenfield A, Koyama CE (1997) Expression of a novel *Sry* transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet* 16: 480–482.
41. Bach V, Shen WH, Engelen HA, Parker KL (1996) Developmental expression of mouse *Sox9* gene, a novel regulator of the steroid hydroxylase. *Mol Endocrinol* 10: 654–662.
42. Inami A, Malmstedt T, Kobayashi S, Lee J, Chinn S, et al. (2005) Genetic imprinting of XE spermatogenesis and XE oocytes measured from XE⁺-*Sox9* chromatin testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4030–4034.
43. Chanut AA, Gagnier EE, Levey S, Talbot MM, de Rooij DG, et al. (2011) *RPO1*/beta-catenin signaling pathway regulates spermatid differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS ONE* 6: e25041. doi:10.1371/journal.pone.0025041
44. Malmstedt-Talbot J, van den Bergen J, Koyama CE, Chhabraier M, Lee J, et al. (2007) *Dpp4f* and *Dpp4f2* are closely related *Sox9* motif genes restricted to placental cells and the germ line. *Sex Cells* 2: 10–20.
45. Li H, McLennan C, Chapman D, Chhabraier M, Pedersen M (2008) *Cyp19a1* expression in mouse fetal cells is required to maintain male germ cells in an undifferentiated state during embryogenesis. *PLoS ONE* 3: e37901. doi:10.1371/journal.pone.0037901
46. MacLean G, Li H, Metzger D, Chhabraier M, Pedersen M (2007) Apoptotic selection of germ cells in testis of *Cyp19a1* knockout mice. *Endocrinology* 142: 4850–4857.
47. Baker AK, Miska DM, Ho YC, Goodfellow ML, Carpenter AE, et al. (2005) In germ cells of mouse embryonic testis, the decision to enter meiosis precedes genomic DNA replication. *Nat Genet* 37: 1428–1434.
48. Arango MA, Lovell-Badge R, Haininger RH (1998) Targeted mutagenesis of the embryonic mouse *hcy* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 95: 449–459.
49. De Smet B, Bann F, Bann M, Robert N, Dardennes M, Mouton R, et al. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18: 2804–2807.
50. Schlegel E, Wilson M, Wilkins D, Koyama CE (2005) SOX9 is expressed during testis differentiation in mice and germline with *Sox9* to activate the *Arh* promoter in vivo. *J Biol Chem* 280: 20181–20188.
51. Polanco JC, Wilkins D, Davidson TL, Knight D, Koyama CE (2010) *Sox10* gene-of-function across XX sex reversal in mice implicates for human 22q13.2 deletion of sex development. *Nat Med* 16: 608–614.
52. Hoshizaki M, Goto Y, Schmitt H, Lacombe C, Goffeys H, et al. (2006) Testis cord differentiation after the sex-determination stage is independent of *Sox9* but *Sox10* in the combined absence of *Sox9* and *Sox10*. *Dev Biol* 307: 301–312.
53. Patton E, Hagglin JM, White S, Sekine H, Yin Y, et al. (2011) Identification of *SOX9* as an XX male sex-reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest* 121: 820–824.
54. Mutsaers DM, Murphy MW, Brown AL, Goffeys H, Hagglin JM, et al. (2011) *EMERT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 478: 101–105.
55. Gao Y, Maki S, Allen M, Zhang X, Ding J, et al. (2008) The *Wnt5a* tumor gene, *Wnt5a*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11827–11832.
56. Kim Y, Kobayashi A, Sekine H, Chhabraier M, Brown J, et al. (2008) *Yfp9* and *Sox9* act as activator ligands to regulate *Sox9* expression and determination. *PLoS Biol* 6: e187. doi:10.1371/journal.pbio.0180187
57. Miquena H, Robert N, Anay K, Dardennes M, Ho Y, et al. (2011) Epigenetic programming of *D* proteins (*D*-*Sox9*) is expressed in the early embryonic gonad and participates in the initial nuclear transcription of the *SOX9* protein. *Dev Dyn* 340: 3255–3263.
58. Adams DR, McLennan A (2002) Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells resulting from epigenetic reprogramming. *Development* 129: 1108–1114.
59. Wilkins D, Martinson F, Braddock R, Wilson MJ, Graham AN, et al. (2007) *Sox9* cell differentiation is induced both cell-autonomously and through paracrine signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol* 307: 111–124.
60. Kim Y, Hagglin JM, Sekine H, Parker KL, Lovell-Badge R, et al. (2007) *Mitochondrial growth factor receptor 1* regulates proliferation and *Sox9* differentiation during male sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16559–16563.
61. Jost A (1977) *Berberidic acid* in differentiation *acridine de* *Parabryon de* *legum*. *Arch Anat Histol Microscop Exp* 271–416.
62. McLennan A (1991) Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *Bioessays* 13: 151–154.
63. Metzger DJ, Apter JL, Boyd EA, Miquena HM, Therman BC, et al. (2006) Identification of the transcription network governing mammalian sex determination by exploiting tissue-specific susceptibility to sex reversal. *Genes Dev* 20: 2021–2034.
64. Hagglin JM, Brown-Karad S, Parrot F, Parker KL (2004) Development of a steroidogenic factor 1/C10 transgenic mouse line. *Genetics* 166: 410–421.
65. Hagglin JM, Hagglin JM, F O, E L (1994) *Microbiology of the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
66. Braddock R, Wilkins D, Koyama CE (2007) Comparative analysis of mammalian SRY activation. *Sex Dev* 1: 408–416.
67. Wilkins DG (1994) *Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos*. Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos Oxford: Oxford University Press: 75–83.
68. Mouton R, Hache A, Hache Y, Goodfellow F, Brown A, et al. (1996) *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14: 69–78.
69. Bach V, Schmidt K, Haininger-Rappaport J, Bach MR, Wagner M (2001) *Sox9* expression inhibition in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor *Sox1*. *Mol Cell Biol* 21: 6991–6993.

70. Vernet M, Dumortier C, Beckette-Egly C, Oudet-Aldegheri M, Glendon P, et al. (2008) Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* 147: 90–110.
71. DeRubeck M, DeCoursey DJ (1993) RNA-RNA in situ hybridization using digoxigenin-labeled probes: the use of high-molecular-weight polyvinyl alcohol in the alkaline phosphatase indoxylcarotolyl tetrazolium reaction. *Anal Biochem* 215: 80–88.
72. Jovanov SA, Liu YF, Dagal B (2012) Testis development requires the repression of Wnt1 by Fgf signaling. *Dev Biol*.
73. Hunt PA, Warshawski G, Loveman H, Stallings J, Leibler R, et al. (1998) Germ cell loss in the XY male mouse; altered X-chromosome dosage affects prenatal development. *Mol Reprod Dev* 46: 104–111.

B. Développement normal et pathologique de l'ovaire

Après avoir étudié le rôle de *Sox9* et de *R-spondin1* dans les inversions de sexe qui surviennent au moment du développement de la gonade, nous nous sommes intéressés au rôle de *R-spondin1* dans la physiologie de l'ovaire adulte.

Comme nous l'avons démontré dans le deuxième article, une régulation fine entre la voie femelle, activée par *R-spondin1* et la voie mâle, activée par *Sox9* dans des conditions normales de développement, est requise. Ces facteurs sont des acteurs principaux du développement des gonades chez la souris. Il serait intéressant par la suite, d'évaluer le rôle de *R-spondin1* dans la gonade adulte. Dans cette étude nous avons étudié spécifiquement le rôle de *R-spondin1* dans la physiologie de l'ovaire adulte.

Pour cela deux modèles murins ont été utilisés : Tout d'abord le modèle de souris invalidé pour le gène *R-spondin1*, *Rspo1KO*, utilisé dans les études décrites précédemment. Nous avons également utilisé un modèle murin d'expression ectopique de *R-spondin1*, R26 : *Rspo1*^{TG/+} croisé avec la lignée *Sf1:Cre*, utilisée également dans les études décrites précédemment (Bingham et al., 2006). Cette recombinaise Cre permet l'expression de *R-spondin1* de façon ectopique dans les tissus somatiques de la gonade (folliculaires et stéroïdogènes).

1. Patron d'expression de *R-spondin1* et de la voie de signalisation WNT/ β catenin .

Il est déjà démontré que *R-spondin1* et la voie *WNT*/ β *catenin* sont fortement exprimés dans l'ovaire embryonnaire et sont nécessaires à la différenciation ovarienne (Chassot et al., 2008). Pour définir ses rôles potentiels dans la physiologie de l'ovaire adulte, nous avons tout d'abord établi le patron d'expression et d'activation des acteurs principaux de la voie de signalisation de *R-spondin1* à différents temps autour de la naissance et à l'âge adulte.

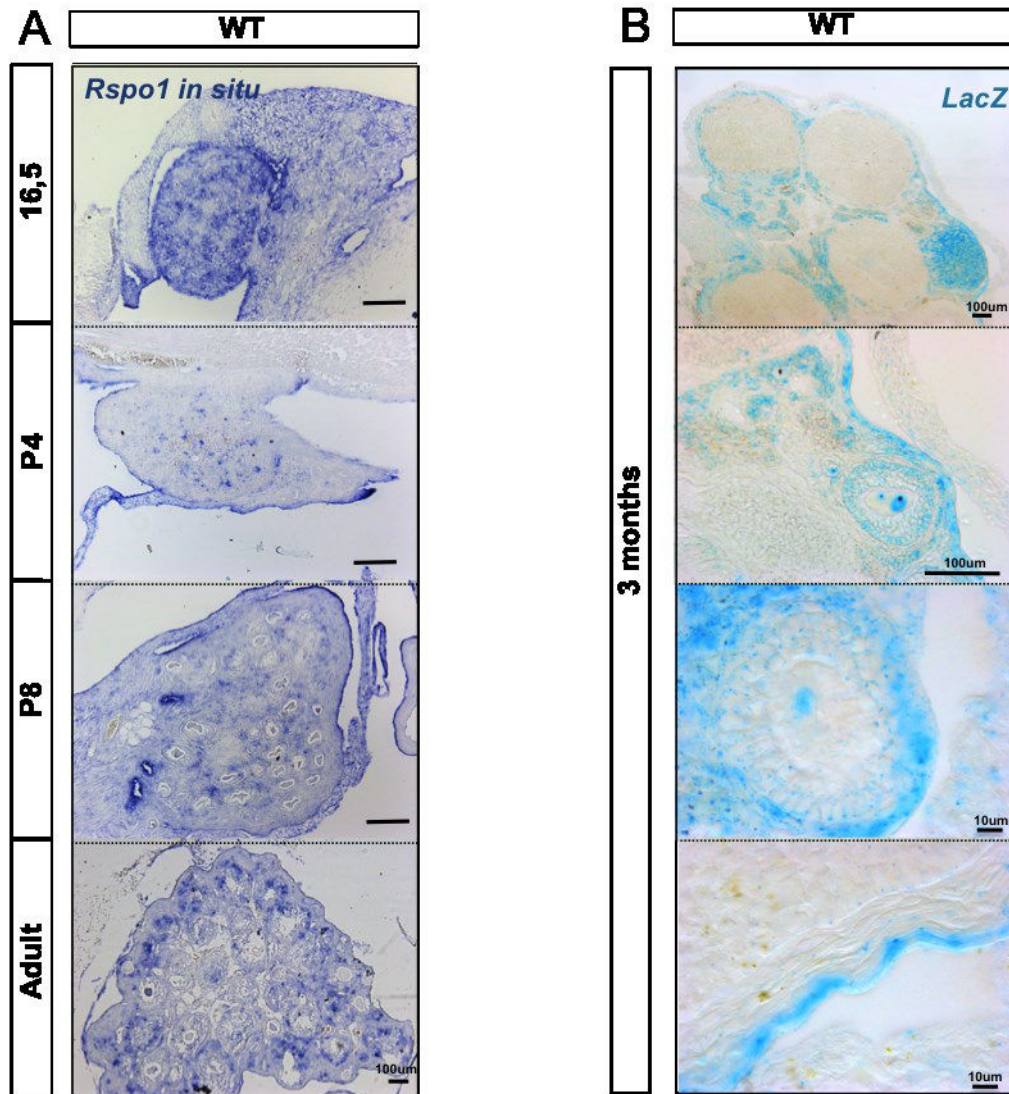


Figure 10 : Expression de *R-spondin1* et activation de la voie *Wnt/βcatenin* en aval. A) Patron d'expression de *R-spondin1* par hybridation *in situ* dans l'ovaire à différents stades du développement : son expression est forte au stade embryonnaire (16.5 *jpp*) et se situe dans l'ESO et les cellules de la pré-granulosa. Son expression diminue ensuite après la naissance (P4, P8) et devient restreinte à l'ESO et faiblement dans les follicules formés à P8. Son expression est faible à l'âge adulte et se situe dans l'ESO et dans les follicules situés dans la partie corticale de l'ovaire. **B)** Coloration β-galactosidase d'ovaires de souris *Axin2/LacZ* âgées de 3 mois. L'expression d'*Axin2* se situe principalement dans l'ESO et dans les follicules du stade primaire à pré-antral.

Comme démontré par des expériences de qPCR réalisées précédemment, *R-spondin1* est très fortement exprimé dans l'ovaire embryonnaire (Auguste et al., 2011)(Uhlenhaut et al., 2009). Par hybridation *in situ* sur des sections d'ovaires à plusieurs âges, nous avons montré que son expression diminue autour de la naissance (P0) et un deuxième pic d'expression plus faible apparaît entre P0 et P8. Par la suite, une faible expression de *R-spondin1* est maintenue à l'âge adulte dans certains follicules ovariens tandis que l'expression de *R-spondin1* reste forte dans l'épithélium de surface ovarien (ESO)(Figure 10A).

Nous avons ensuite caractérisé la localisation de l'activation de la voie *WNT/βcatenin* dans l'ovaire de souris âgées de 3 mois. Pour cela, nous avons utilisé un modèle murin dans lequel la séquence *LacZ* a été inséré sous le contrôle du promoteur du gène *Axin2* (Lustig et al., 2002), une cible directe de *βcatenin*. Nous avons visualisé l'activation de la voie par un marquage β-galactosidase. L'analyse de plusieurs sections a permis de définir que l'activation de la voie βcatenin se situe principalement au niveau de l'ESO ainsi que des follicules ovariens. L'analyse de plusieurs coupes a permis de définir que les follicules marqués sont des follicules allant jusqu'au stade pré-antral (Figure 10B).

Nous avons également analysé des ovaires de souris *LGR4:LacZ* et *LGR5:LacZ*, âgées de 3 mois, afin de voir la localisation de deux récepteurs potentiels de *R-spondin1* dans l'ovaire. Les marquages β-galactosidase sur cryosections montrent que ces récepteurs sont principalement localisés au niveau des corps jaunes et très faiblement au niveau de l'ESO (Figure 11a). Comme pour l'analyse de l'activation de la voie *WNT/βcatenin*, l'analyse de plusieurs coupes en série est nécessaire pour confirmer ce résultat.

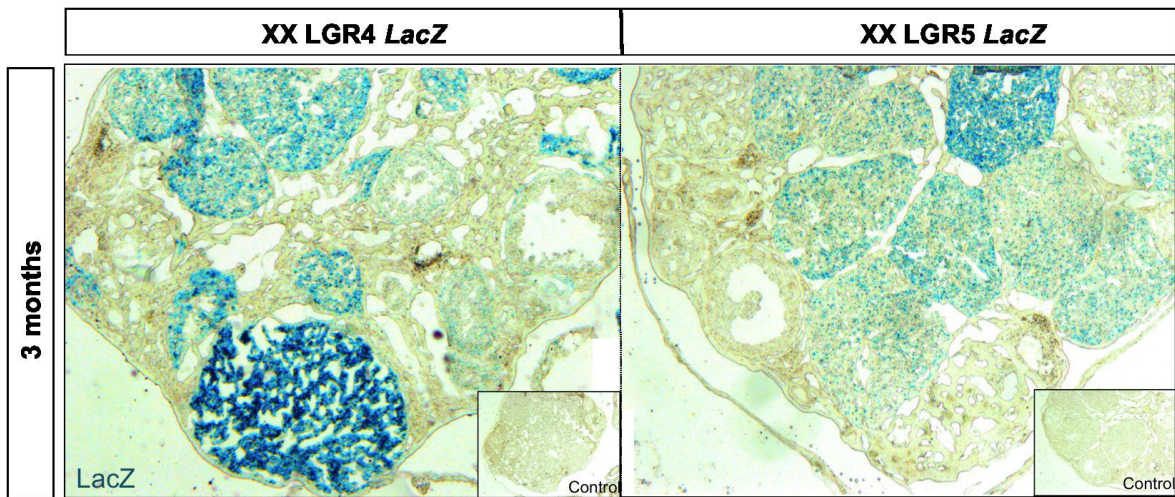


Figure 11a: Localisation des récepteurs LGR4 et LGR5 dans l'ovaire de souris adulte. Le marquage β -galactosidase effectué sur des ovaires de souris *Lgr4:LacZ* et *Lgr5:LacZ* montre que les deux récepteurs de *Rspo1* sont exprimés fortement dans les corps jaunes des ovaires normaux et semblent très légèrement exprimés dans d'autres structures telles que l'ESO et certains follicules.

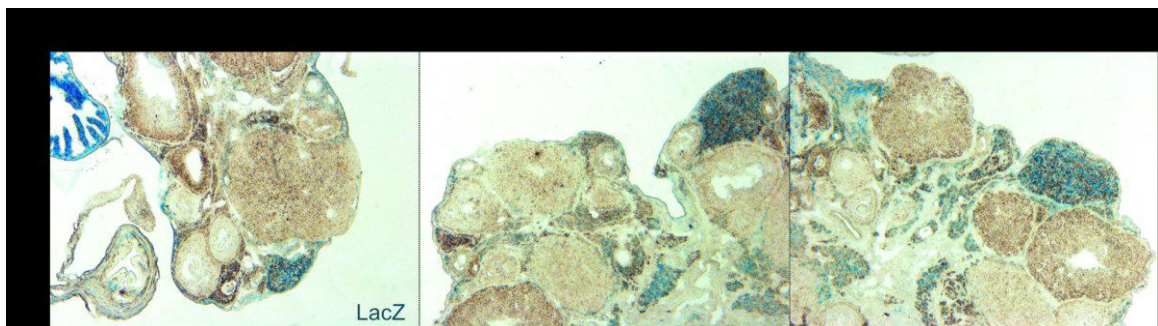


Figure 11b: Activation de la voie *Wnt/ β catenin* dans les ovaires de souris *Rspo1KO*. Coloration β -galactosidase d'ovaires de souris *Axin2/LacZ; Rspo1+/+* et *Axin2/LacZ; Rspo1-/-*. Chez les contrôles, l'expression d'*Axin2* se situe principalement dans l'ESO et dans les follicules du stade primaire à pré-antral. Chez les souris *Rspo1-/-* l'expression d'*Axin2* se situe également dans les mêmes structures.

2. Rôle de *R-spondin1* dans le développement et le maintien de l'ovaire.

Après avoir défini l'expression de *R-spondin1* dans l'ovaire de souris du stade embryonnaire au stade adulte, ainsi que l'activation de la voie de signalisation *WNT/βcatenin* en aval, nous avons voulu évaluer si son rôle dans l'ovaire adulte est crucial. Pour cela nous avons utilisé le modèle de souris invalidées pour le gène *R-spondin1*, généré au laboratoire (Chassot et al., 2008). Les individus XX *Rspo1*KO présentent une inversion de sexe partielle, comme décrit dans cette étude. Cependant, ce modèle murin a été généré et étudié de façon approfondie lors du développement foetal mais très succinctement chez l'adulte.

Nous avons tout d'abord procédé à l'analyse des ovaires de souris *Axin2/LacZ ; Rspo1+/+* et *Axin2/LacZ ; Rspo1-/-* afin de voir si la voie de signalisation *WNT/βcatenin* est réprimée en absence de *R-spondin1*. Nous avons observé que la voie *WNT/βcatenin* reste activée dans les gonades *Rspo1-/-* de façon similaire aux ovaires contrôles (Figure 11b), dans l'ESO et les follicules jusqu'au stade pré-antral. Cependant, l'analyse d'un plus grand nombre de sections de ces ovaires permettra de confirmer les stades folliculaires où *Axin2* est exprimée.

Nous avons ensuite étudié des gonades de souris de fond génétique mixte C57Bl6/129SV âgées de 6 mois et nous avons tout d'abord observé une taille réduite de ceux-ci comparés aux ovaires de souris contrôles (Figure 12).

L'analyse histologique de ces échantillons montre une variabilité du phénotype entre les individus et selon le plan de coupe. Certaines gonades *Rspo1-/-* présentent plusieurs corps jaunes alors que d'autres présentent de grandes cavités dépourvues d'ovocytes (Figure 13). Dans les cas les plus marqués, les gonades semblent ne contenir que du tissu conjonctif. Enfin, un épaissement plus ou moins notable de l'ESO est observé dans la majorité des gonades invalidées pour le gène *R-spondin1* (Figure 14). Cet épaissement est constitué de cellules de forme allongée comme le montrent les noyaux de ces cellules. Cette forme n'est jamais retrouvée parmi les cellules de l'ESO de souris contrôles.

Nous avons par la suite effectué un marquage Picro Sirius Red qui marque les fibres de collagène de type I et III en plus des muscles. Ce marquage a révélé que les

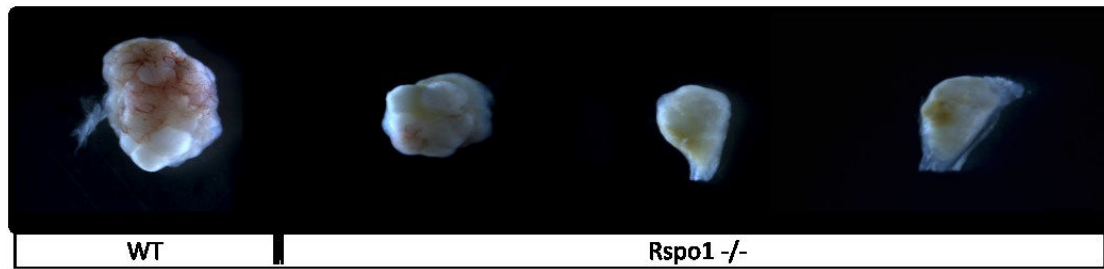


Figure 12: Vue macroscopique des ovaires de souris contrôles et *Rspo1KO* âgées de 6 mois. Les ovaires mutés pour le gène *Rspo1* sont de taille inférieure par rapport à un ovaire contrôle.

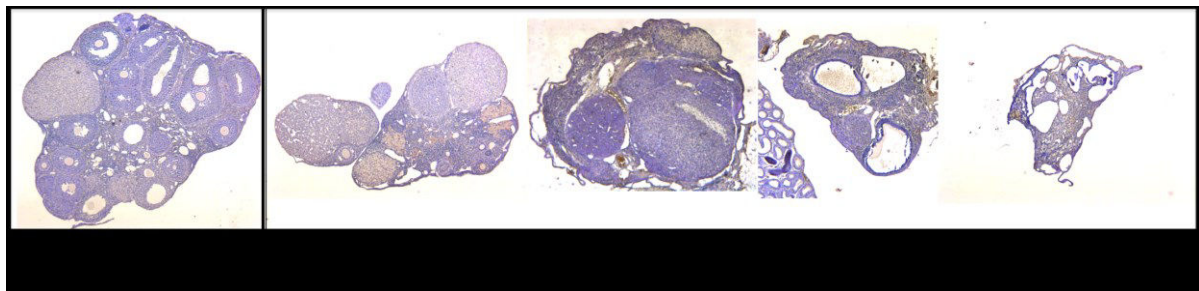


Figure 13: Histologie des ovaires de souris contrôles et *Rspo1KO* âgées de 6 mois. Les ovaires invalidés pour le gène *Rspo1* présentent une histologie fortement anormale, avec moins de follicules ainsi que dans certains cas des cavités vides d'ovocytes.

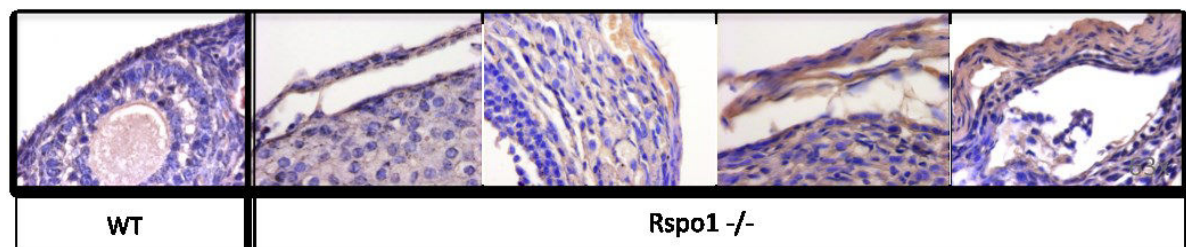


Figure 14: Vue détaillée de l'ESO de souris contrôles et *Rspo1KO* âgées de 6 mois. Chez les souris *Rspo1KO*, l'ESO est épaissi et les cellules qui le constituent ont une morphologie allongée différente de celle de l'ESO de souris contrôles qui est constitué d'une simple couche de cellules épithéliales

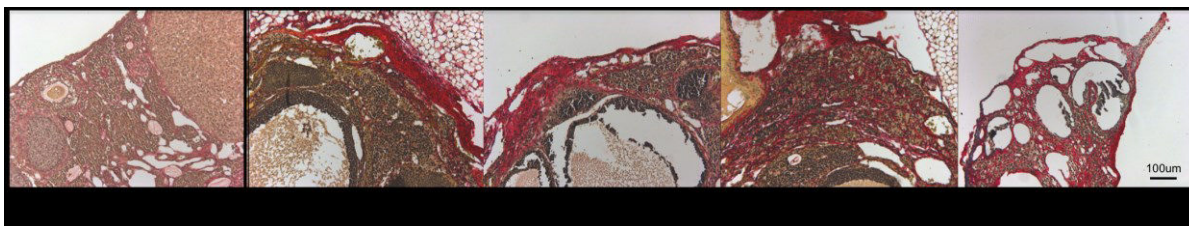


Figure 15: Localisation du collagène dans les ovaires de souris contrôles et *Rspo1KO* âgées de 6 mois. Les ovaires des souris *Rspo1KO* produisent un niveau très élevé de collagène comparé aux souris contrôles, situé principalement au niveau de la surface ovarienne.

gonades des individus XX *Rspo1KO* possèdent plus de fibres de collagène comparé aux ovaires contrôles (Figure 15). Plus précisément, cette accumulation de collagène se situe principalement au niveau de l'ESO quand celui-ci est épaissi et dans l'ensemble de l'ovaire dans le cas des individus présentant les phénotypes les plus marqués (riche en tissu conjonctif).

L'histologie des gonades de femelles XX *Rspo1KO* âgées de 6 mois montre clairement que l'organe est sévèrement affecté par l'inactivation du gène de *R-spondin1*. Nous avons par la suite essayé de caractériser le phénotype observé d'un point de vue moléculaire. Tout d'abord avec un anticorps anti-FOXL2 (marqueur des cellules de la granulosa des follicules et la thèque), nous avons évalué la présence ou non d'une inversion de sexe chez ces individus. Nous avons pu observer la présence de follicules chez les souris contrôles ainsi que chez les souris *Rspo1KO* (Figure 16).

E-Cadherin est exprimée dans les jonctions adhérentes de certaines cellules épithéliales et permet de visualiser les cellules de l'épithélium de surface ovarien. E-Cadherin n'est pas exprimée à la surface de la plupart des gonades *Rspo1KO*. Seuls 1/3 des gonades gardent ce marquage. Cependant, les cellules de l'épaississement au niveau de l'ESO ne sont pas marquées ; seule la couche extérieure montre la présence de E-Cadherin. Le fait que ces cellules perdent l'expression de E-Cadherin indique qu'elles perdent leurs propriétés de cellules épithéliales. Afin d'étudier si ces cellules sont des cellules mésenchymateuses, nous avons utilisé un marqueur de ces cellules, la Vimentine. (Figure 16) L'absence de marquage par la Vimentine suggère que les cellules de l'épaississement de l'épithélium ovarien ne sont pas des cellules

mésenchymateuses. Cela reste cependant à confirmer avec d'autres marqueurs de cellules mésenchymateuses.

WT1 a été montré comme étant un activateur potentiel de RSP01 dans le rein (Motamedi et al., 2014). Nous avons montré que WT1 est exprimé dans l'épithélium de surface des ovaires de souris contrôles mais pas dans celui des gonades *Rspo1KO*. Cela suggère que l'expression de WT1 est régulée par RSP01 soit par un mécanisme de rétrocontrôle de RSP01 sur WT1 ou parce que les cellules anormales de l'épithélium de surface n'ont plus la capacité d'exprimer WT1 (Figure 16).

Les souris XX *Rspo1KO* présentent de sévères anomalies au niveau gonadique au stade adulte. De plus, l'ablation de *R-spondin1* au niveau de l'ESO induit des désorganisations et potentiellement des différenciations anormales de ce tissu. Etant donné la forte expression de *R-spondin1* dans l'ESO contrôle, il est vraisemblable que ce facteur est impliqué dans les mécanismes d'ovulation et plus particulièrement dans la réparation de l'ESO après la rupture et l'expulsion de l'ovocyte. Cependant, *R-spondin1* est un gène clé du développement précoce de l'ovaire. Les anomalies observées dans la gonade adulte pourraient provenir d'un défaut de spécification des lignées cellulaires fœtales comme en témoigne l'inversion sexuelle de certaines cellules de la granulosa. Pour étudier le rôle potentiel de *R-spondin1* dans les processus d'ovulation/réparation, il faut utiliser un modèle d'inactivation conditionnelle qui permet la délétion du gène d'intérêt dans l'ovaire différencié.

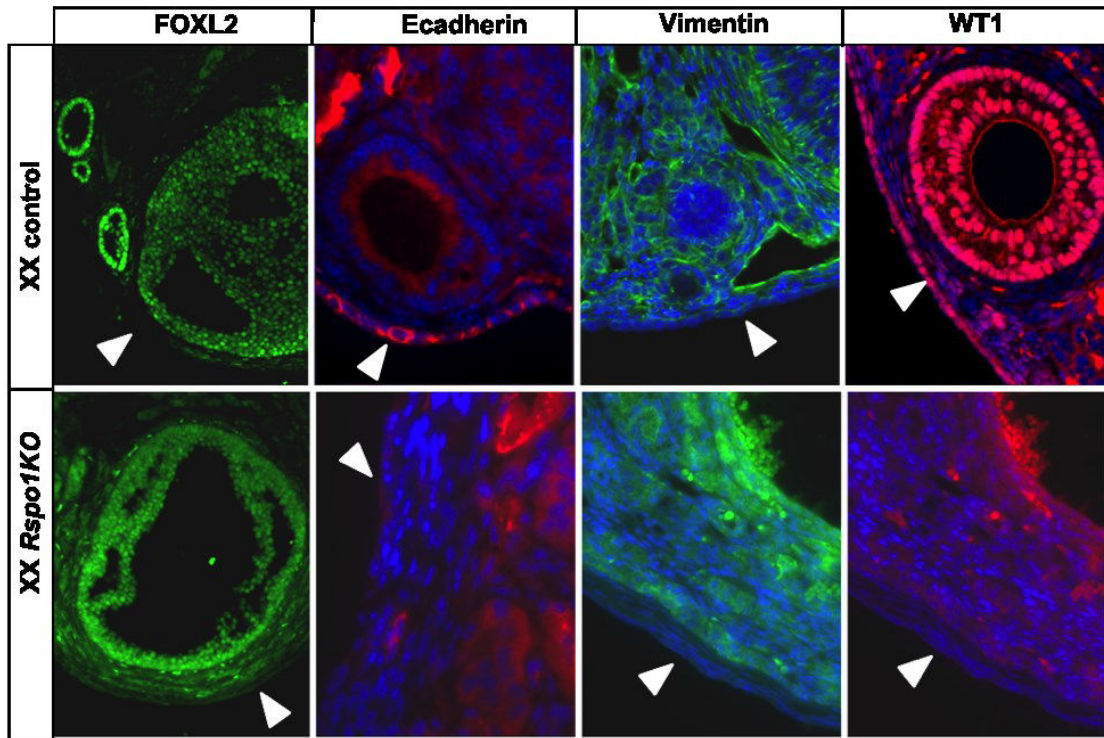


Figure 16: Identification des types cellulaires présents dans les gonades des souris *Rspo1KO* âgées de 6 mois. Présence de follicules chez les souris contrôles et *Rspo1KO* (FOXL2), absence de E-cadhérine dans l'ESO des ovaires *Rspo1KO* sans apparition de marqueurs mésenchymateux tels que Vimentin. Absence également de WT1 dans l'ESO de ces souris.

3. Caractérisation des tumeurs ovariennes dues à l'expression de *R-spondin1*

3.1 Modèle d'expression ectopique de *R-spondin1*

Les résultats de l'étude du rôle de *Rspo1* montre que ce facteur est nécessaire au maintien de l'état quiescent des cellules de pré-granulosa en période fœtale. Son ablation favorise une accélération de la différenciation des cellules de la granulosa et la transdifférenciation de ces cellules en cellules de Sertoli (Maatouk, Mork, Chassot, Chaboissier, & Capel, 2013). Ainsi l'expression de *R-spondin1* semble diminuer dans les cellules folliculaires au cours de leur maturation. Pour étudier si l'expression de *R-spondin1* doit être réprimée au cours du développement ovarien, nous avons réalisé l'étude du mutant de gain-de-fonction de *R-spondin1*. Afin d'exprimer de *R-spondin1* de façon ectopique, le laboratoire d'Andreas Schedl a généré un modèle murin dans lequel le ADNc de *R-spondin1* est inséré dans le *locus* de *Rosa26* (données non publiées). Le croisement de ces souris avec la lignée transgénique *Sf1:Cre* (Bingham et al., 2006) a permis d'induire l'expression de *R-spondin1* dans les cellules somatiques de l'ovaire. Les individus XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* et *Rosa26^{Rspo1/Rspo1}; Sf1:Cre* sont hypofertiles jusqu'à l'âge de 4 mois et deviennent infertiles dès l'âge de 6 mois. Nous devons cependant compléter ces résultats préliminaires en augmentant le nombre de femelles étudiées (Tableau 1).

Les individus XY *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* et *Rosa26^{Rspo1/Rspo1}; Sf1:Cre* sont fertiles et se reproduisent de façon normale. Ceci est du probablement au fait que le site *Rosa26* est très peu exprimé dans le testicule.

L'expression de *R-spondin1* dans les ovaires résulte en une hyperplasie de ces organes en comparaison avec des ovaires de souris contrôles du même âge. Les ovaires mutants présentent un grand nombre de kystes visibles à la surface de l'ovaire (Figure 17- panel du haut). Nous avons vérifié que l'expression ectopique de *R-spondin1* dans l'ovaire est bien effective en effectuant des hybridations *in situ* avec la sonde dirigée contre *R-spondin1* utilisée précédemment pour établir le patron d'expression de ce dernier. L'expression observée dans l'ovaire contrôle est celle observée précédemment (Figure 10), et son expression est fortement augmentée

	Up to 4 months old	6 months old
Control	7.25 pups/female (\mp 1.16)	
Gain of function	1.25 pups/female (\mp 1.58)	0

Tableau 1 : Nombre de souriceaux par portée chez des souris contrôles et des souris XX *Rosa26^{Rspo1/+} ; Sf1:Cre* et *Rosa26^{Rspo1/Rspo1} ; Sf1:Cre*

dans les ovaires des individus *Rosa26^{Rspo1/+} ; Sf1:Cre* (Figure 17- panel du milieu). De plus, un marquage β -galactosidase sur des ovaires contrôles et *R26^{Rspo1/+} ; Axin2:LacZ ; Sf1:Cre* montre une forte activation de la voie de signalisation canonique de la *β catenin*, dont *Axin2* est la cible directe (Figure 17- panel du bas). Ceci montre que *R-spondin1* active la voie WNT/ β catenin canonique dans notre modèle murin.

L'analyse histologique par marquage HE (Hématoxyline-Eosine) des ovaires hyperplasiques observés chez les souris XX *Rosa26^{Rspo1/+} ; Sf1:Cre* et *Rosa26^{Rspo1/Rspo1} ; Sf1:Cre* a été effectuée en collaboration avec le Dr. Katja Teerds (Utrecht University, Netherlands). Cette analyse montre une très grande variabilité du phénotype avec la présence de kystes souvent remplis de sang (Figure 17- panel du haut). Des kystes similaires n'ont pas été observés dans les contrôles examinés. De plus, les souris XX *Rosa26^{Rspo1/+} ; Sf1:Cre* présentent un nombre réduit de follicules antraux à 12 mois mais semblent en revanche contenir plus de tissu interstitiel dans lequel est retrouvé un grand nombre de follicules d'apparence pré-antrale (Figure 18A et cercles noirs). Ces follicules pourraient correspondre à des follicules atrétiques. Certains corps jaunes contiennent des érythrocytes (Figure 18B). Ce phénomène n'est jamais observé dans les ovaires de souris contrôles. Enfin, certains kystes observés présentent des kératinocytes au niveau de leur paroi (Figure 18C).

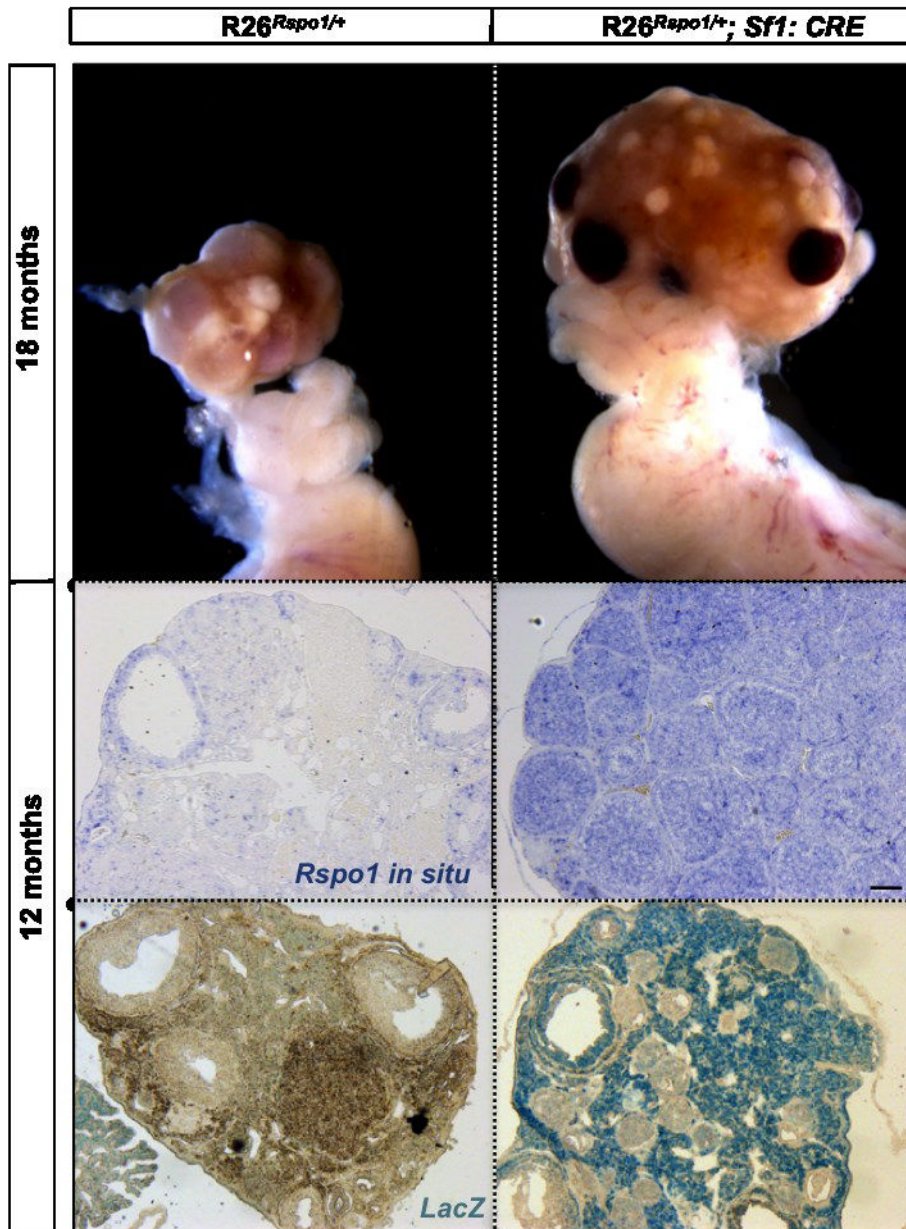


Figure 17 : Gain de fonction de Rspo1 dans les ovaires de souris adultes.

Vue macroscopique d'un ovaire contrôle et d'un ovaire R26^{Rspo1/+}; Sf1: CRE. L'ovaire transgénique montre une augmentation importante de sa taille comparé à un ovaire contrôle et quelques kystes remplis de sang sont apparents à sa surface. Rspo1 est exprimé partout dans l'ovaire transgénique, alors que son expression est située au niveau de l'ESO et des follicules du cortex ovarien dans l'ovaire contrôle. L'activation de la voie de signalisation Wnt/ β catenin par marquage β -galactosidase est visualisée et elle est importante dans les ovaires de souris R26^{Rspo1/+}; Axin2 :LacZ ; Sf1: CRE, comparée à celle d'un ovaire contrôle.

3.2 Apparition du phénotype

Les ovaires des souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* sont donc hyperplasiques et présentent plusieurs anomalies en comparaison avec des ovaires contrôles. Nous nous sommes intéressés par la suite à l'apparition du phénotype. A P28 (jour post partum), l'analyse histologique montre un grand nombre de follicules (Figure 19-panel du haut). Afin de déterminer si ces follicules sont dépourvus d'ovocytes, comme ceux observés à des temps plus tardifs (12-18 mois), nous avons effectué des marquages HE sur des coupes sérielles pour pouvoir visualiser chaque follicule en entier. Nous avons ainsi observé qu'à cet âge tous les follicules, sauf quelques rares exceptions, ont un ovocyte. Ceci reste cependant à quantifier. La même analyse à P40 montre que, contrairement à P28, les follicules se situant principalement dans la partie médullaire de l'ovaire sont dépourvus d'ovocytes. Ces résultats nous ont permis de conclure que le phénotype folliculaire des ovaires de souris *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* adultes est déjà présent à P40.

A ce stade la question se pose de savoir si le nombre accru de follicules que l'on observe à P28, P40 et plus tardivement, est du à la formation d'un plus grand nombre de follicules au moment de la folliculogénèse ovarienne. Une seconde explication peut être une diminution de l'atrésie folliculaire qui a normalement lieu dans un ovaire contrôle. Pour déterminer cela nous avons quantifié par PCR quantitative l'expression de gènes spécifiquement exprimés dans les ovocytes (*Mvh*) et les cellules de la granulosa (*Foxl2*) de souris *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* et de souris contrôles pendant (P0) et à la fin (P8) de la folliculogénèse normale. Nous avons également quantifié l'expression de *R-spondin1* aux mêmes âges afin de confirmer une fois de plus notre modèle. *R-spondin1* est exprimée plus fortement chez les souris *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* que contrôles à P0 et à P8 (Figure 20A). P0 est un temps qui se situe entre les deux vagues de la folliculogénèse, et P8 correspond à la fin de la folliculogénèse chez la souris. A P0, nous n'observons pas de différence d'expression des gènes *Foxl2* et *Mvh* ce qui suggère que le nombre d'ovocytes et de cellules de granulosa est similaire entre ovaires mutants et contrôles (Figure 20B). A P8, nous observons une baisse significative de l'expression de *Mvh* dans les ovaires mutants ($p < 0.05$). A P8, les cellules de la granulosa prolifèrent pour constituer les follicules primaires et secondaires. Cette réduction d'expression de *Mvh* n'est peut-être pas

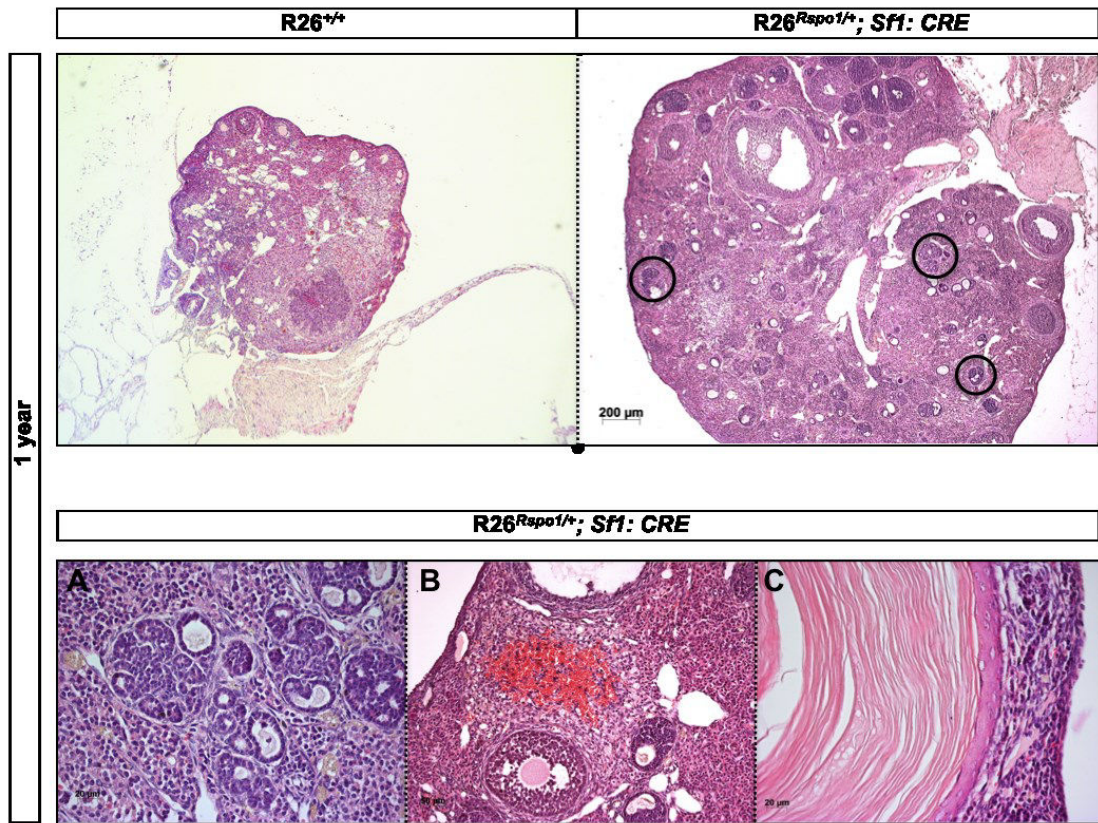


Figure 18 : Histologie des ovaires des souris R26^{Rspo1/+}; Sf1: CRE.

L'analyse montre que ces ovaires présentent un grand nombre de follicules pré-antraux anormaux qui ne sont pas présents dans les ovaires de souris contrôles (panel du haut). Les anomalies observées sont principalement des structures folliculaires anormales dépourvues d'ovocytes (**A**), la présence d'érythrocytes dans des corps jaunes (**B**) et la présence de keratinocytes sur la paroi interne de certains kystes (**C**).

due à une diminution du nombre d'ovocytes mais à une augmentation des autres composants cellulaires de l'ovaire. Pour estimer cela, nous avons réalisé des expériences d'immunodétection en utilisant un anticorps dirigé contre MVH (Mouse Vasa Homologue), qui marque toutes les cellules germinales. En quantifiant les ovocytes et en rapportant ce chiffre à la surface ovarienne quantifiée nous obtenons les données regroupées dans la figure 20C. Ces données suggèrent une légère baisse du nombre d'ovocytes dans les ovaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* comparés aux ovaires de souris contrôles du même âge (P7). Cependant ces résultats sont préliminaires et doivent être répétés sur un plus grand nombre d'individus pour être statistiquement significatifs. Ces données indiquent que le nombre de follicules formés dans ces ovaires est équivalent entre ovaires mutants et contrôles au cours de la folliculogénèse. Le grand nombre de follicules observés à des temps plus tardifs pourrait donc être dû à un défaut d'atrésie folliculaire, qui conduirait à une accumulation de follicules anormaux.

3.3 Caractérisation des structures folliculaires anormales

Après avoir déterminé le temps d'apparition des anomalies des ovaires de souris *Rosa26^{Rspo1/Rspo1}; Sf1:Cre*, nous avons mieux caractérisé le phénotype observé.

3.3.1 Les cellules constituant les structures folliculaires anormales ont une double identité

Tout d'abord nous avons caractérisé les structures folliculaires anormales afin de comprendre de quels types cellulaires elles sont constituées. Nous avons donc utilisé des anticorps dirigés contre FOXL2 et N-Cadherin qui sont des marqueurs des cellules de la granulosa et avons observé que ces structures anormales sont positives pour ces 2 marqueurs. Elles sont donc constituées de cellules de la granulosa et ont une structure très désorganisée comparée aux follicules normaux (Figures 21-22).

Les cellules de la granulosa proviennent de l'ESO, précédemment épithélium cœlomique, comme décrit dans l'introduction. Ces cellules font partie au départ d'un

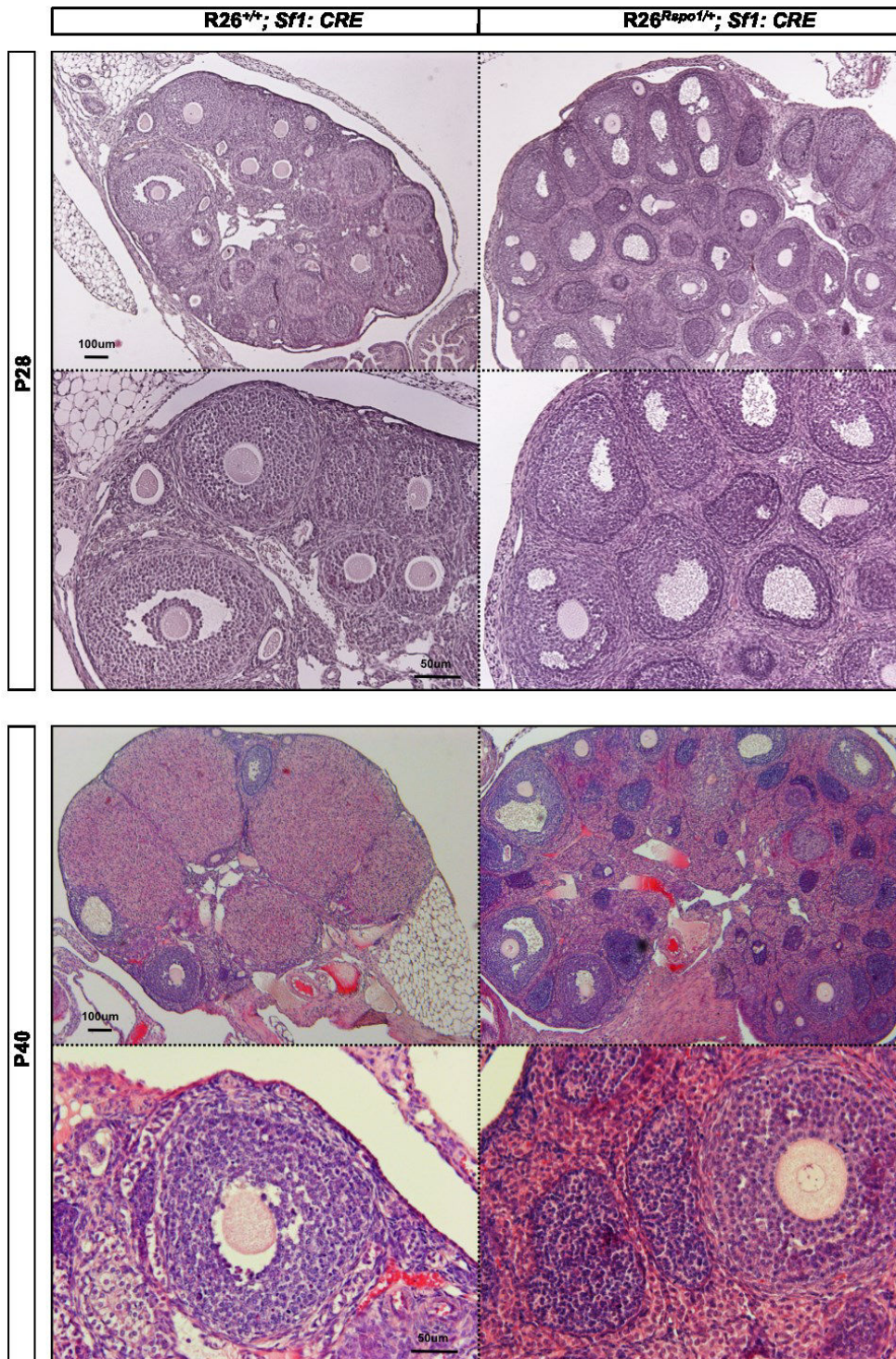


Figure 19: Analyse histologique des souris contrôles et gain de fonction de *R-spondin1* autour de la puberté. A P28, un grand nombre de follicules dont certains semblent anormaux ont pu être observés dans les ovaires de souris R26^{Rspo1/+}; Sf1: CRE. Plusieurs ovocytes ont cependant pu être observés (panel du haut). A P40 en revanche, les structures folliculaires anormales sont dépourvues de leurs ovocytes (panel du bas).

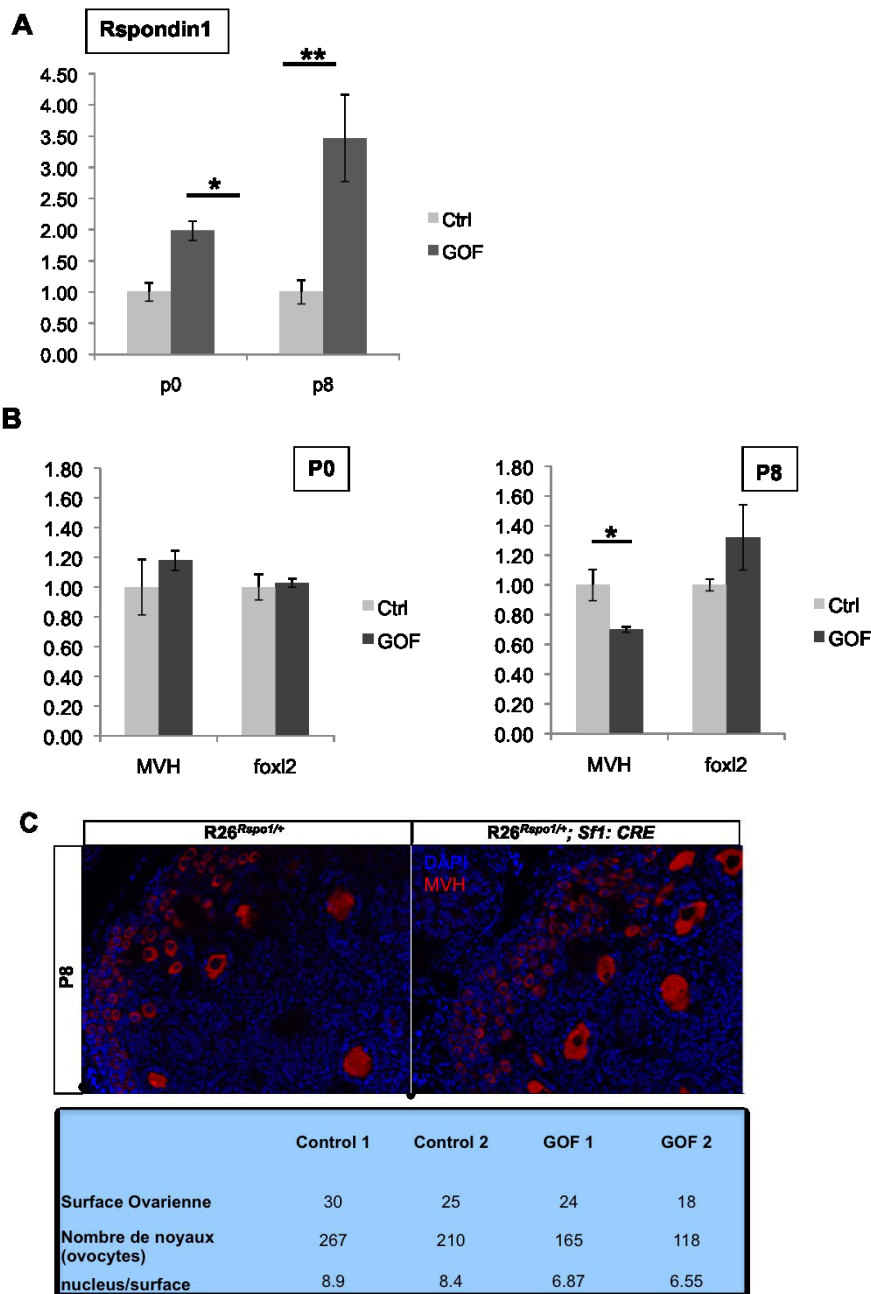


Figure 20: Quantification des cellules FOXL2 et MVH positives dans des ovaires contrôles et gain-de-fonction de *R-spondin1* à P0 et P8. **A)** L'expression de *R-spondin1* est plus importante chez les individus XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* comparés aux contrôles, confirmant ainsi notre modèle de gain-de-fonction. **B)** A P0 nous n'observons pas de différence d'expression de FOXL2 et MVH entre les contrôles et les souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*. A P8 cependant, une réduction significative d'expression de MVH est observée entre les contrôles et les souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* ($p < 0.05$). **C)** Cette réduction est observée et quantifiée également en immunologie sur des coupes d'ovaires contrôles et XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* à P8.

épithélium, ce qui nous a amené à vérifier l'expression des marqueurs épithéliaux Kératine18 et Pan-cytokératine. Nous avons observé que ces structures folliculaires sont positives pour ces deux marqueurs, qui sont également présents dans l'ESO des souris contrôles et faiblement dans les follicules de ces ovaires (Figure 22). Ces résultats montrent que les cellules de la granulosa qui constituent les structures folliculaires anormales continuent à exprimer parallèlement des marqueurs typiques des cellules dont elles proviennent (Kératines). Ces résultats suggèrent que le maintien de l'expression de *R-spondin1* dans les cellules de la granulosa résulte en un problème de différenciation de ces cellules. Celles-ci pourraient ainsi garder une capacité à se différencier en différents types cellulaires comme les kératinocytes (Figure 18).

Nous avons ensuite utilisé un anticorps qui reconnaît les deux formes de β catenin, la forme active qui est nucléaire et la forme impliquée dans l'adhésion cellulaire, qui se situe à la membrane de la cellule. Dans les ovaires de souris contrôles, nous avons détecté la présence de β catenin à la membrane des cellules de la granulosa des follicules anormaux (Figure 23). Dans les ovaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*, les cellules qui forment les structures folliculaires anormales expriment également β catenin au niveau de leur membrane. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de marquage nucléaire dans les cellules de la granulosa jusqu'au stade de corps jaune. Ceci pourrait être dû à la forte accumulation de β catenin membranaire qui pourrait masquer le marquage nucléaire, ou pourrait également suggérer que dans ces cellules, la voie β catenin canonique n'est peut-être pas la principale, bien que ceci est peu probable étant donné que nous avons montré la forte activation d'*Axin2*, une cible directe de β catenin dans les ovaires *R26^{Rspo1/+}; Axin2:LacZ; Sf1: CRE* (Figure 17-panel du bas).

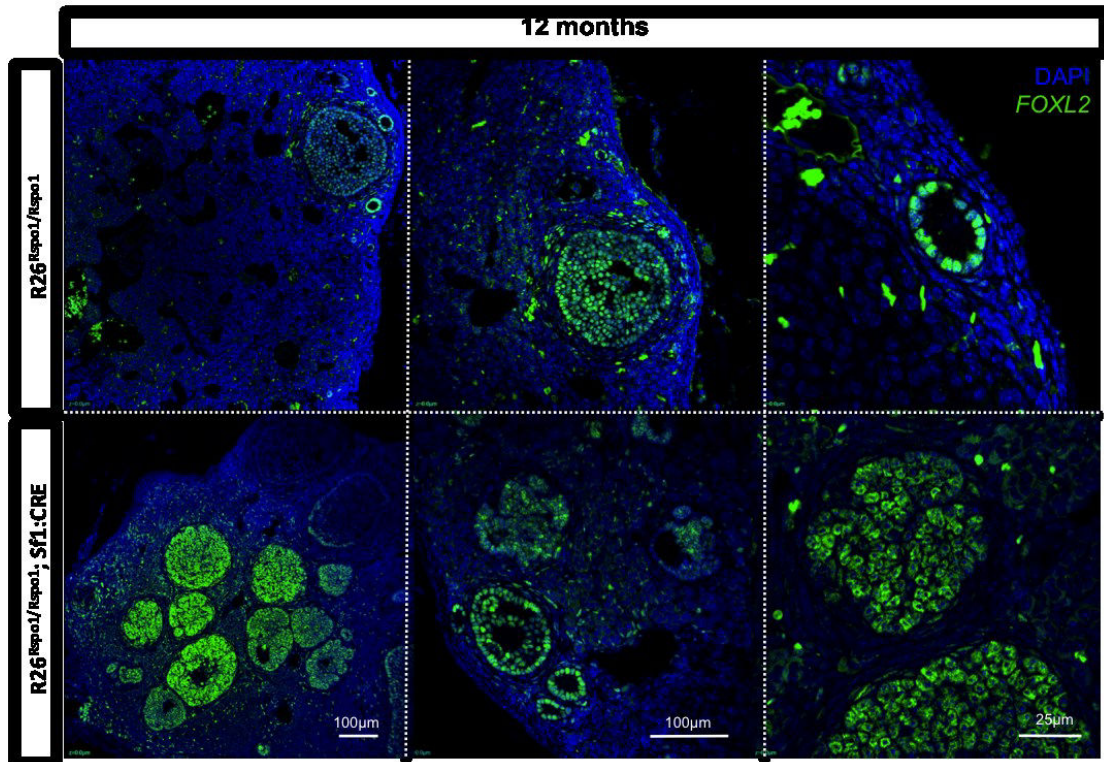


Figure 21 : Les structures folliculaires des souris *Rosa26^{Rspo1/Rspo1}; Sf1:Cre* âgées d'un an sont constituées de cellules de la granulosa. Les follicules des ovaires de souris contrôles ainsi que des souris *Rosa26^{Rspo1/Rspo1}; Sf1:Cre* expriment FOXL2. Ces structures désorganisées sont composées de cellules de la granulosa.

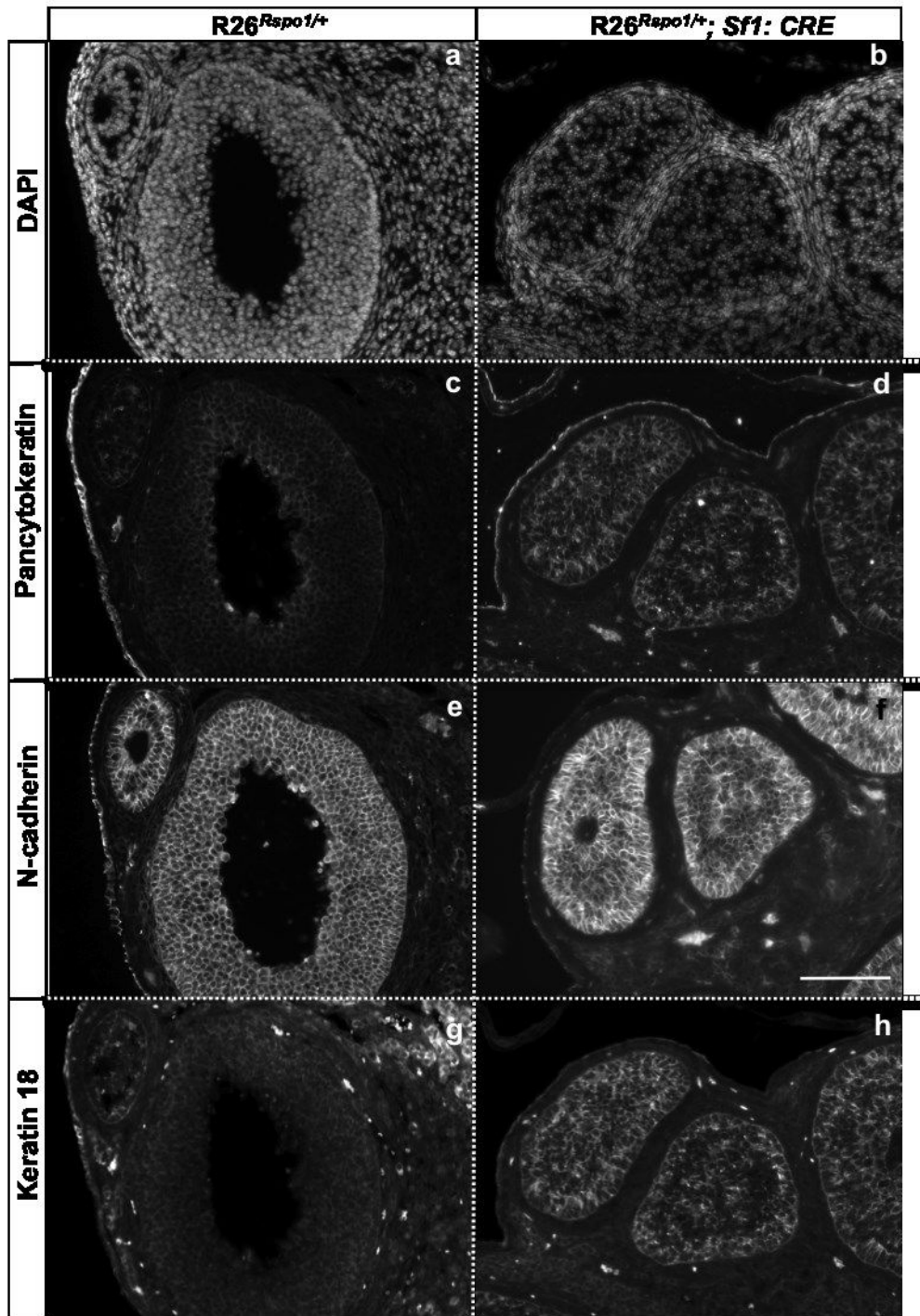


Figure 22: Les structures folliculaires de souris de 1 an présentent des caractéristiques de cellules de l'ESO, ainsi que de cellules de la granulosa. Dans les ovaires de souris contrôles, différents membres de la famille des kératines sont exprimés dans l'ESO, et peu dans les follicules, qu'ils soient primaires ou antraux. Les structures folliculaires des ovaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*, expriment eux aussi ces marqueurs localisés normalement seulement au niveau de l'ESO. La N-cadherin est exprimée dans l'ESO et les follicules chez les contrôles ainsi que les souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*.

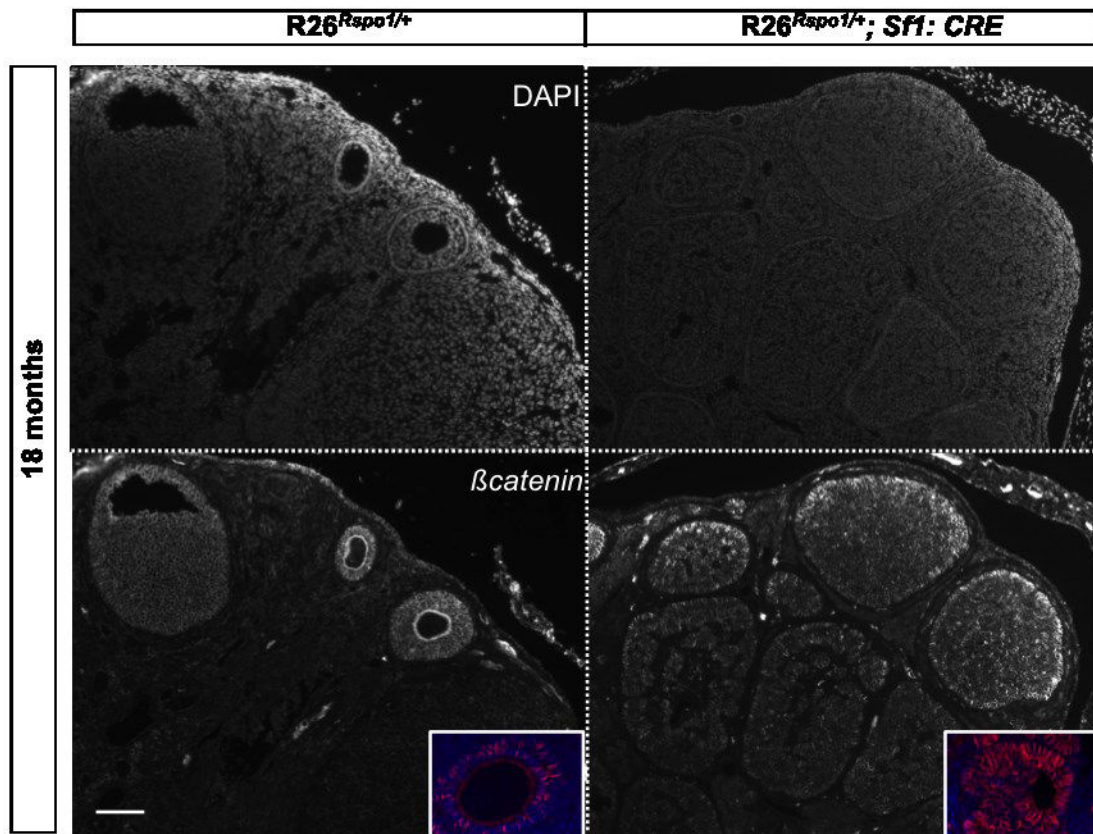


Figure 23: Les structures folliculaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* expriment β catenin à leur membrane. Dans les ovaires de souris contrôles, la β catenin est exprimée à la membrane des cellules de la granulosa jusqu'à ce qu'elles se lutéinisent. Les souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* présentent le même marquage membranaire dans les cellules de la granulosa des structures folliculaires anormales.

3.3.2 Les structures folliculaires anormales sont quiescentes

Les ovaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* contiennent un grand nombre de structures folliculaires comparés aux ovaires de souris contrôles et ces structures sont dépourvues d'ovocytes autour de P40. Nous avons réalisé des marquages afin d'évaluer le statut prolifératif et apoptotique de ces structures. Pour visualiser la prolifération au sein de ces structures, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la protéine Ki67 qui est associée à la prolifération cellulaire puisque elle est active pendant les phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et mitose). Nous avons observé des cellules en prolifération parmi les cellules des follicules normaux dans les ovaires contrôles et les ovaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*. Cependant, les structures folliculaires anormales ne présentent pas de marquage Ki67, ce qui indique qu'elles

ne prolifèrent pas (Figure 24). Il semblerait qu'il y ait plus de prolifération dans le stroma des ovaires *Rosa26^{Rspo1/+} ; Sf1:Cre* mais ceci reste à quantifier.

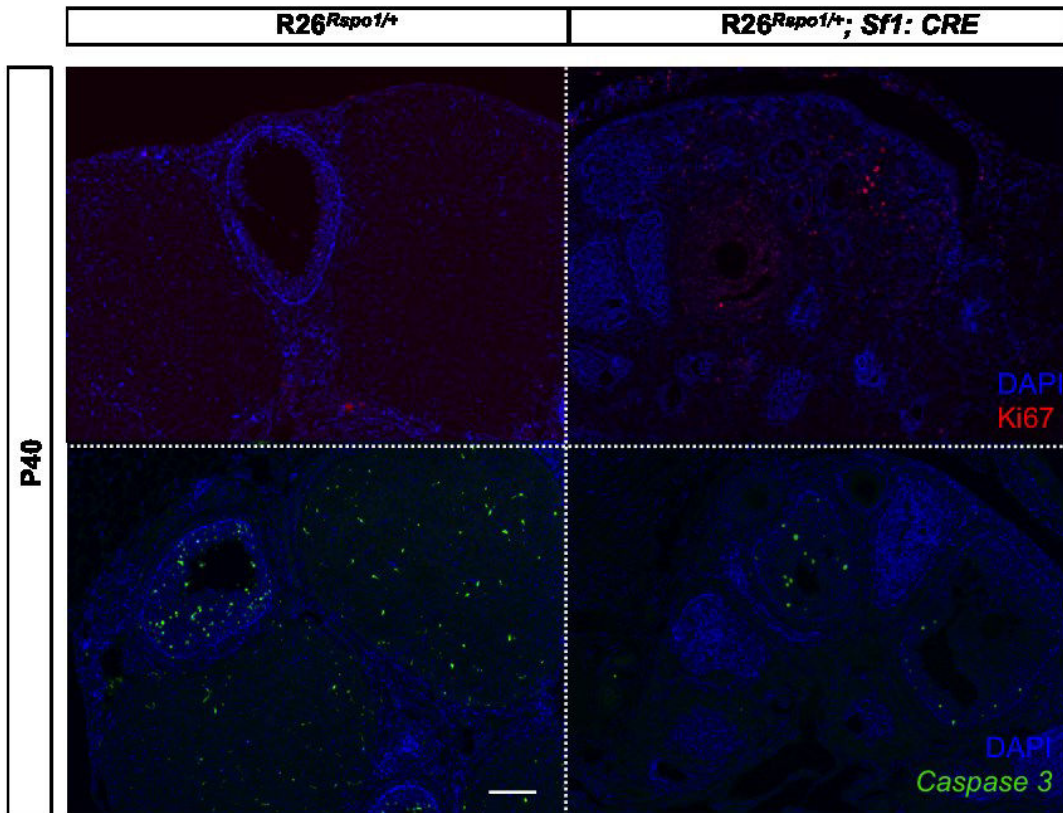


Figure 24: Prolifération et apoptose au sein des ovaires surexprimant *Rspo1*. Les structures folliculaires anormales ne prolifèrent pas (Ki67) et n'entrent pas en apoptose (Caspase3). Dans les ovaires contrôles, les cellules de la granulosa prolifèrent principalement dans les follicules primaires et ce jusqu'au stade antral. De l'apoptose est également observée à des degrés différents en fonction du stade folliculaire.

Pour visualiser l'apoptose dans ces mêmes structures, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la Caspase3, un médiateur important de l'apoptose cellulaire. Dans les ovaires de souris contrôles, il y a des cellules en apoptose dans les follicules ovariens et dans les corps jaunes. Les follicules normaux des ovaires de souris *Rosa26^{Rspo1/+} ; Sf1:Cre* présentent eux aussi des cellules en apoptose. Cependant, les structures folliculaires anormales sont dépourvues de marquage Caspase 3 (Figure 24). Ces résultats montrent que les structures folliculaires observées dans les ovaires *Rosa26^{Rspo1/+} ; Sf1:Cre* sont en état de quiescence puisqu'elles ne sont ni prolifératives ni apoptotiques. Ceci est surprenant puisqu'en l'absence d'ovocytes, ces structures

devraient entrer en atresie et disparaître par apoptose. Le maintien de l'expression de *R-spondin1* agirait comme un facteur de survie.

3.3.3 Les structures folliculaires ne se développent pas au delà du stade pré-antral.

Nous nous sommes ensuite intéressés à déterminer le stade folliculaire correspondant aux structures folliculaires décrites ci-dessus. Nous avons pour cela réalisé un marquage avec un anticorps dirigé contre l'AMH, exprimé dans les follicules primaires jusqu'au stade pré-antral, et un anticorps dirigé contre la Vimentine, qui n'est exprimée dans les follicules qu'à partir du stade antral. Plus précisément elle est exprimée par les cellules de la granulosa dites murales dans les follicules antraux, et dans toutes les cellules des corps jaunes.

Nous avons observé que les structures folliculaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* ne sont pas marqués par l'AMH, mais sont en revanche marquées par la Vimentine (Figure 25). Ceci suggère que les cellules de ces structures se sont développées jusqu'au stade où les follicules perdent l'expression d'*Amh* et acquièrent l'expression de Vimentin.

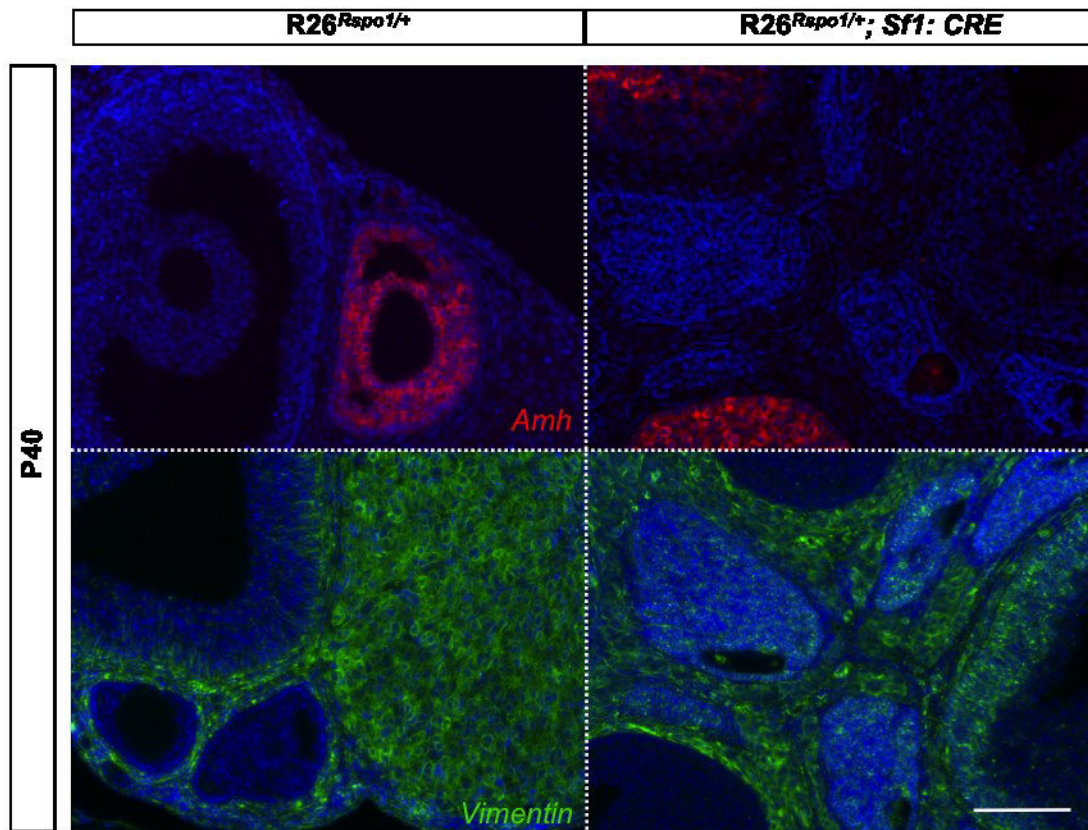


Figure 25: Stade folliculaire des structures anormales dans les ovaires des souris R26^{Rspo1/+}; Sf1: CRE à P40. Les structures folliculaires anormales n'expriment pas l'*Amh* qui est exprimé dans les follicules normaux jusqu'au stade pré-antral. Elles expriment en revanche Vimentin qui est exprimé dans les corps jaunes, ainsi que dans les cellules de la granulosa murale des grands follicules antraux, dans les ovaires contrôles.

3.3.4 Les structures folliculaires anormales sont désorganisées

Les marquages effectués précédemment pour déterminer la nature des cellules qui constituent les structures folliculaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* ont montré que bien que ces cellules soient des cellules de la granulosa (FOXL2 positives) ayant gardé des caractéristiques des cellules de l'ESO dont elles proviennent (Kératines), elles semblent cependant désorganisées par rapport à des cellules de follicules normaux (Figure 21- 60x). Afin de voir l'organisation de ces structures folliculaires nous avons réalisé un marquage picro Sirius red, qui marque les collagène de type I et III qui sont des composants du tissu conjonctif ovarien. Les structures folliculaires anormales présentent une désorganisation importante de

leurs composants cellulaires. Les cellules de la thèque, qui forment normalement une fine couche autour des cellules de la granulosa, forment dans les ovaires des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* un amas cellulaire qui ne semble pas entourer les cellules de la granulosa. Ces dernières, semblent condensées par rapport aux cellules de la granulosa de follicules normaux (Figure 26). Nous avons ensuite utilisé un anticorps dirigé contre *Sf1* afin de vérifier la nature des cellules observées avec le marquage Picro Sirius Red. *Sf1* est fortement exprimé dans les cellules de la thèque et à un moindre niveau dans les cellules de la granulosa (Hinshelwood et al., 2003). Ce marquage montre que dans les ovaires de souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* les cellules aux abords des cellules de la granulosa expriment très fortement SF1, de la même façon que les cellules de la thèque de follicules normaux dans les ovaires de souris contrôles. Ces cellules sont des cellules stéroïdogènes de la thèque et semblent complètement désorganisées. Cependant, il est difficile de déterminer si cette désorganisation provient de la nature ambiguë et/ou de la désorganisation même des cellules de la granulosa des structures folliculaires anormales (Figure 27).

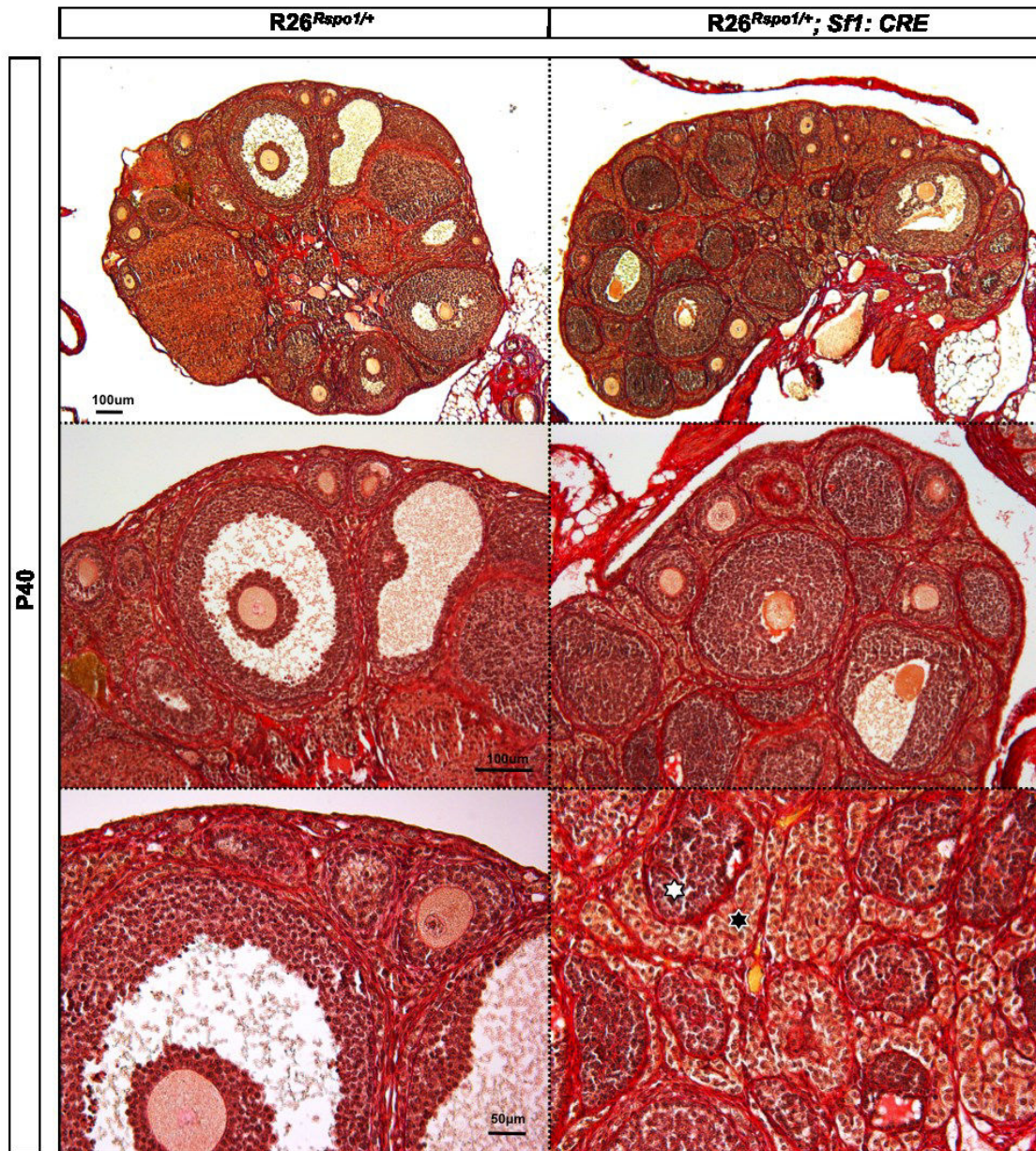


Figure 26: Les structures folliculaires anormales des ovaires *Rosa26^{Rspo1/+}; Sfl:Cre* sont désorganisées. Le marquage Picro Sirius Red effectué pour visualiser le collagène de type I et le collagène de type III, présents dans les tissus conjonctifs ovariens, montre une désorganisation des cellules de la granulosa ainsi que des cellules de la thèque. Chez le contrôle, ces dernières sont normalement organisées en fine couche qui entoure les cellules de la granulosa des follicules normaux. (étoile blanche : cellules de la granulosa des structures folliculaires anormales, étoile noire : cellules de la thèque).

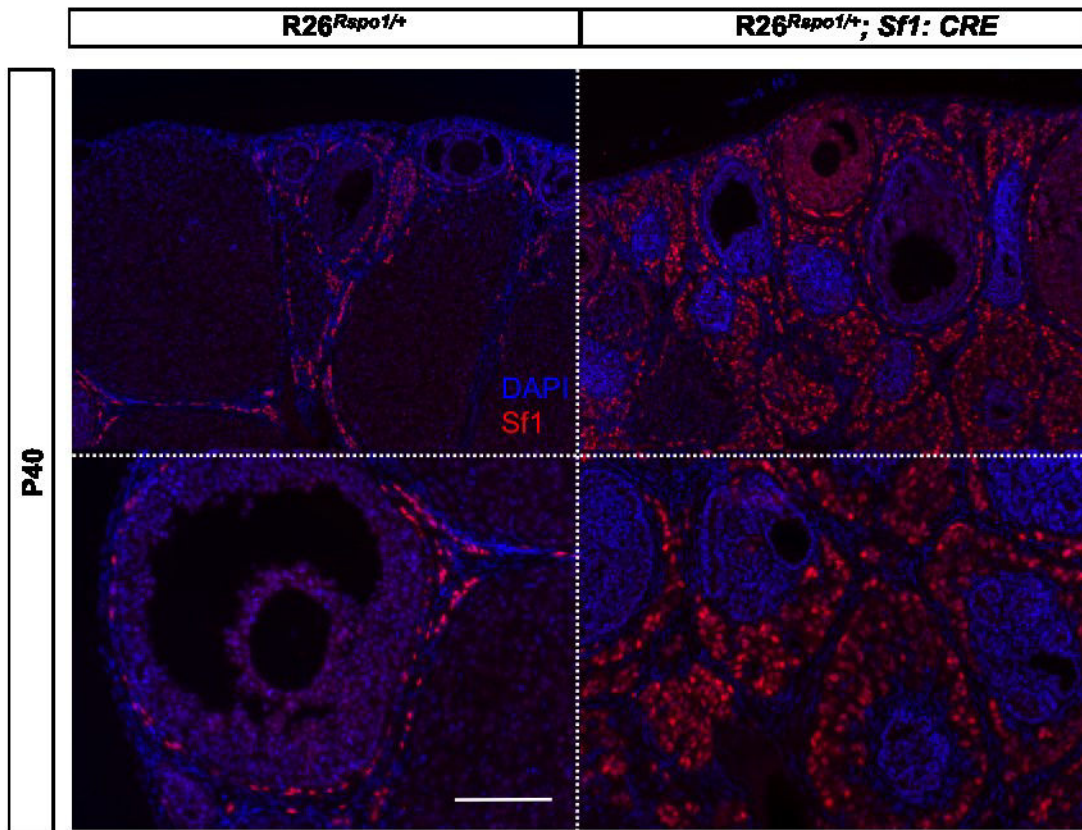


Figure 27: Organisation des cellules de la thèque dans les ovaires des souris R26^{Rspo1/+}; Sf1: Cre à P40. Sf1 est exprimé dans les cellules de la thèque et plus faiblement dans les cellules de la granulosa des ovaires contrôles. Les cellules granulosa des follicules anormaux n'expriment pas Sf1, mais en revanche les cellules de la thèque sont très fortement marquées et semblent désorganisées et plus nombreuses que dans les ovaires contrôles.

3.3.5 Caractérisation de la vascularisation des ovaires *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*

L'analyse approfondie de l'histologie des ovaires de souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* effectuée en collaboration (Dr. Katja Teerds) a montré la présence d'érythrocytes dans des structures de corps jaunes (Figure 18). Nous avons donc cherché à mettre en évidence un défaut de vascularisation pouvant expliquer ce phénotype. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre Pecam qui est un marqueur de néo-vascularisation, beaucoup utilisé pour étudier la vascularisation aux stades embryonnaires. Chez les souris contrôles, Pecam marque le stroma ovarien autour des follicules, ainsi que les corps jaunes, hautement vascularisés. En revanche nous n'avons pas observé de marquage Pecam dans les structures folliculaires anormales (Figure 28). Il n'y a donc pas de vascularisation dans ces structures.

Nous avons ensuite utilisé un anticorps dirigé contre l'alpha-sma (alpha smooth muscle actin) qui marque les cellules myoépithéliales qui entourent les vaisseaux sanguins de taille importante. Ce marquage ne montre pas de différence entre les ovaires contrôles et les ovaires de souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*. Dans les deux cas, alpha-sma est localisée dans le tissu interstitiel entourant les follicules normaux et/ou les structures folliculaires anormales (Figure 28).

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de défaut important dans la vascularisation des ovaires *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*. La présence d'érythrocytes dans le corps jaunes des souris *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* proviendrait d'une infiltration érythrocytaire anormale.

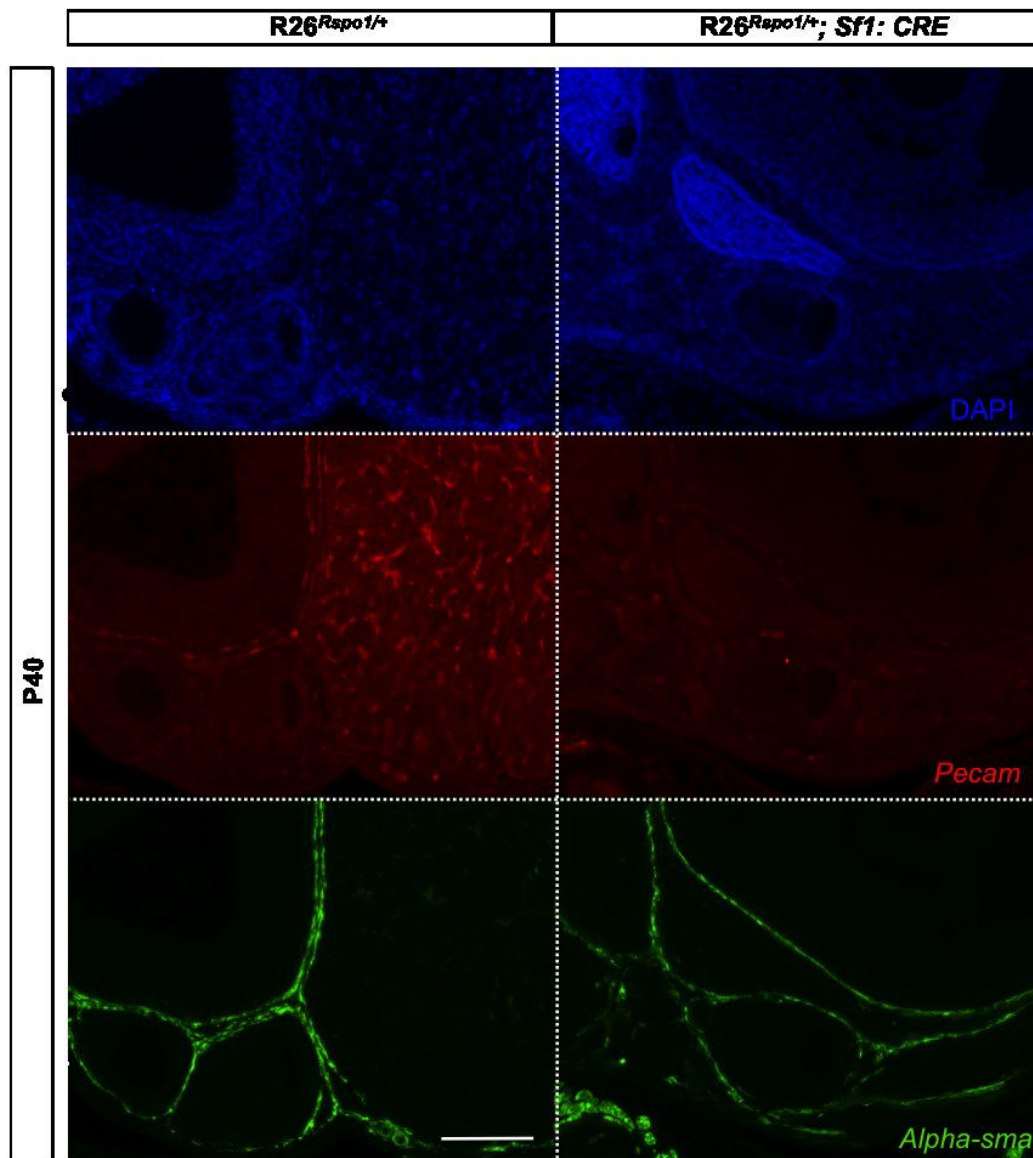


Figure 28: Vascularisation des ovaires R26^{Rspo1/+}; Sf1: CRE et contrôles à P40. Pecam est exprimé dans les corps jaunes des ovaires contrôles montrant la néo-vascularisation de ce dernier. Les follicules anormaux des souris R26^{Rspo1/+}; Sf1: CRE ne présentent pas de marquage Pecam. Le marquage des cellules endothéliales avec Alpha-sma ne montre pas de différence entre les ovaires contrôles et les ovaires R26^{Rspo1/+}; Sf1: CRE.

3.4 Apparition de kystes remplis de sang

Durant l'analyse macroscopique des ovaires de souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* nous avons observé que ces ovaires présentent un nombre important de kystes remplis de sang, ce qui arrive plus rarement chez les femelles contrôles (Figure 17). Nous avons voulu savoir si les kystes remplis de sang que nous avons observé sont des kystes d'inclusion, formés suite à l'ovulation. Pour cela, nous avons effectué des expériences de superovulation sur des souris contrôles et des souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* âgées de 4 semaines. Cet âge a été choisi parce que les souris répondent mieux à la stimulation hormonale car les voies hormonales ne sont pas encore établies. Nous avons prélevé les ovaires des souris à deux temps différents après ovulation pour voir l'évolution éventuelle dans l'apparition de kystes. Dès 5 jours après ovulation, les ovaires de femelles contrôles ne présentent plus de signes apparents d'ovulation, la blessure survenue au moment de l'expulsion de l'ovocyte est réparée. Contrairement, aux ovaires contrôles, dans le cas des ovaires de souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre*, plusieurs kystes remplis de sang ont été observés 5 jours et 15 jours après ovulation (Figure 29). De plus, le nombre de kystes est plus important 15 jours après ovulation, suggérant peut-être l'implication d'un défaut dans la formation des corps jaunes, après ovulation chez les souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* ce qui conduirait à la formation de ce type de kystes.

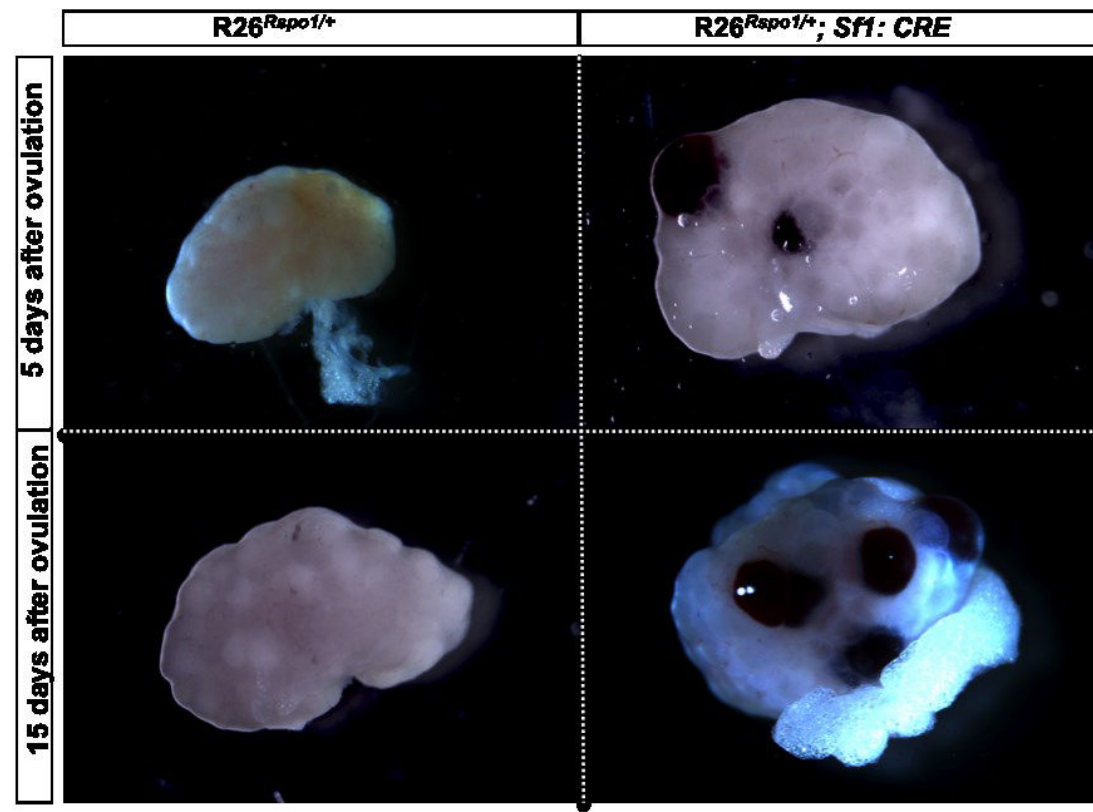


Figure 29: Apparition de kystes remplis de sang après ovulation dans les ovaires de souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*. Après induction de superovulation de souris contrôles et XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* les ovaires ont été prélevés à deux temps différents. Cinq jours après ovulation, les ovaires contrôles ne présentent plus de blessures à leur surface, alors que des kystes remplis de sang sont visibles à la surface des ovaires *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre*. Ce phénomène s'accroît quinze jours après ovulation.

3.5 Apparition de cancers ovariens chez des individus de plus d'un an

Dans certains cas, l'apparition de tumeurs ovariennes a été observée. Elles surviennent chez des individus âgés de plus d'un an chez lesquels le développement tumoral a été détecté à cause d'un gonflement important de l'abdomen des souris. Ces tumeurs sont de taille importante (Figure 30) et leur prévalence reste à évaluer avec un plus grand nombre d'individus. Le type de tumeurs développées chez les individus XX *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre* est actuellement en train d'être caractérisé en collaboration avec des pathologistes de l'hôpital Pasteur de Nice.

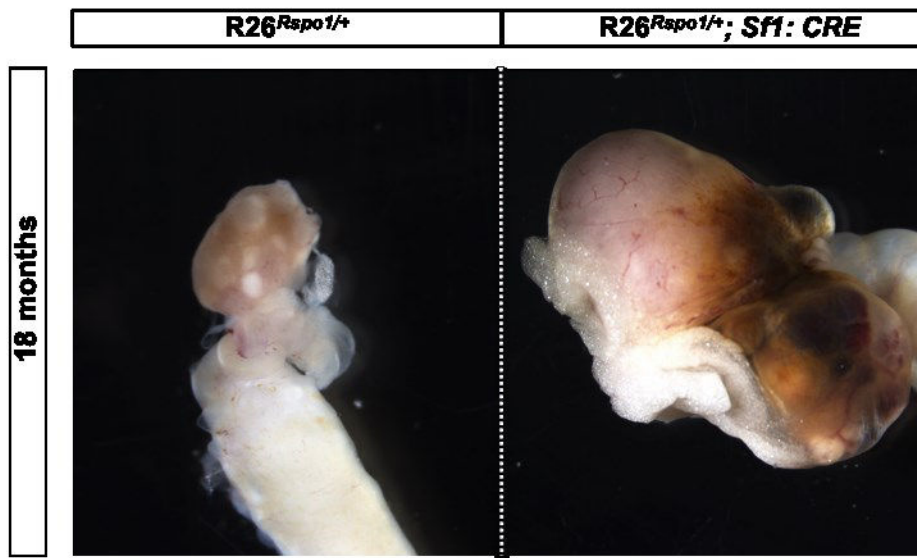


Figure 30: Apparition de tumeurs ovariennes chez les souris *Rosa26^{Rspo1/+}*; *Sf1:Cre*. Nous avons observé l'apparition de tumeurs ovariennes chez certains individus étudiés, âgés de plus d'un an. Ces tumeurs sont d'une taille importante comparées à la taille d'un ovaire non tumoral.

**MATERIEL
-ET -
METHODES**

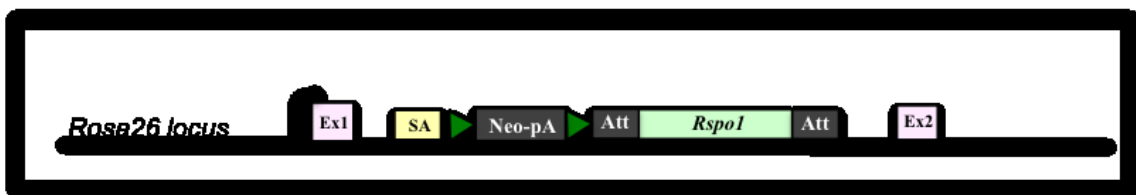
Materiel et méthodes

Souris

Les souris *Rspo1*^{-/-} ont été générées au laboratoire et le modèle a été publié précédemment (Chassot et al., 2008).

Les souris *Rosa 26: Rspo1* ont été générées au laboratoire d'Andreas Schedl par Valérie Vidal (données non-publiées). Le cDNA codant pour *R-spondin1* a été inséré dans le vecteur Rosa21-DEST (Hohenstein et al., 2008). La stratégie de clonage a été basée sur le système Gateway® (Invitrogen). L'ADNc de *R-spondin1* a été clone dans le vecteur pENTR11 (Invitrogen) puis transféré dans le pRosa26-DEST en utilisant la LR clonase II (Invitrogen). Le vecteur obtenu (ci-dessous) a été linéarisé et électroporé dans des cellules souches embryonnaires dérivées de souris 129SV qui ont été sélectionnées par résistance à la néomycine. Les clones où une recombinaison homologue a eu lieu ont été identifiés par analyse southern blot en utilisant des sondes spécifiques du 5' et de la néomycine. Les clones positifs ont été micro-injectés dans des blastocystes afin de générer des souris chimériques.

Le modèle murin déjà publié *Sf1:Cre* a été obtenu par le biais de Keith L. Parker (Bingham et al., 2006).



Génotypage

Les souris *Rspo1*^{-/-} sont génotypées comme décrit par Chassot et al., 2008.

Les souris *Rosa 26: Rspo1* sont génotypées à l'aide de trois amorces afin de discriminer l'allèle *Rosa26* sauvage et l'allèle ciblé (*Rosa26* common S :5'-AGGGAGCTGCAGTGGAGTAG- 3', *Rosa26* WT AS :5'-AGCCTGCCAGAAAGACTCCC-3', *Pgk* prom AS:5'- GAAAAGCGCCTCCCCTACCC-3')

L'allèle *Sf1:Cre* a été détecté en utilisant les primers pour la *Cre*: *Cre* 100 (CAATTTACTGACCGTACAC) et *Cre* 775 (AGCTGGCCCAAATGTTGCTG)

Analyse histologique

Les ovaires ont été collectés à partir de souris d'âges différents, fixés en solution Bouin puis déshydratés progressivement. Ils ont ensuite été inclus en paraffine puis coupés à 5µm et enfin colorés avec de l'hématoxyline et l'éosine.

Immunofluorescence

Les ovaires ont été collectés à différents âges, fixés au paraformaldéhyde 4% sur la nuit, déshydratés progressivement et inclus en paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur sont ensuite effectuées, récupérées sur lame et réhydratées progressivement. Les antigènes sont démasqués en ébouillantant les coupes 2 minutes dans la solution "antigen umasking solution" (Vector). Les sections sont incubées 1h dans une solution de PBS-Tween 0,1%, 3% BSA + 10% NDS à température ambiante, puis à 4°C pendant une nuit avec une solution d'anticorps primaires dans PBS-Tween 0,1%, 3% BSA, 0,1% NDS. Les anticorps primaires sont couplés à des anticorps secondaires fluorescents (1 heure à température ambiante), puis les sections de gonade sont ensuite montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage (Vectashield) qui contient un marquage au DAPI. L'observation est réalisée à l'aide d'un apotome Zeiss.

Les anticorps suivants ont été utilisés:

- Anti Vimentin de lapin (1/200)(Abcam ref :ab92547)
- Anti N-cadherin de lapin (1/200) (Invitrogen ref: 33-3900)
- Anti E-cadherin de souris (1/200)(BD Transduction Laboratories ref :610182)
- Anti SF1 de souris (1/100)(TransGenic Inc ref:KO610)
- Anti Pancytokeratin de souris (1/250)(Sigma ref :C2562)
- Anti WT1 de souris (1/100)(Dako ref: M3561)
- Anti Keratin18 de lapin (1/200)(Abcam ref:ab52948)
- Anti AMH (mis) de chèvre (1/100)(Santa Cruz ref:sc6886)
- Anti MVH de lapin (1/200)(abcam ref ab13840)
- Anti Sox9 de lapin (1/250)(Sigma ref : HPA001758)
- Anti Foxl2 de lapin (1 :200) (collaboration avec [Dagmar Wilhelm](#))

Extraction d'ARN et analyse du niveau d'expression des gènes

Les ovaires de souris âgées de P0 et P8 ont été isolés et congelés en carboglace puis conservés à -80°C. L'extraction des ARN a été effectuée à partir d'un ovaire en utilisant le kit PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, cat# 12183025) et la

transcription inverse en cDNA a été effectuée sur 200ng d'ARN purifié (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen, cat# 28025-013). L'expression génique a été évaluée en utilisant le SybrGreen (Roche, cat # 04 707 516 001) et la fluorescence relative a été quantifiée avec le LightCycler® 480 (Roche). Les primers utilisés sont les suivants:

Gène	Rev primer	Fw primer
<i>MVH</i>	CCAAGATCAGGGGACACAGT	CTTTGGTAAGTGTCACCATTGC
<i>Foxl2</i>	GGCGTCGTGAACTCCTACA	TGCAGATGATGTGCGTGAG
<i>SDHA</i>	TGTTTCAGTTCCACCCACA	TCTCCACGACACCCTTCTG
<i>Rspo1</i>	TTCCAGGGAATGTGATGAA	CTCTTCTGACTTCAACCAG

Coloration β -galactosidase

Les ovaires sont coupés au cryostat (8 μ m d'épaisseur). Les sections sont fixées 10min à 4°C avec de la PFA 0,2%, rincées 2 fois à 4°C avec du PBS-MgCl₂ (2mM) puis 10min avec une solution de rinçage (0,1M Na₂HPO₄, 0,1M NaH₂PO₄, 2mM MgCl₂, 0,01% Na Deoxycholate, 0,02% NP-40). Les sections sont ensuite placées dans une solution de coloration (200mM K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆, 1mg/ml Xgal, solution de rinçage). Une fois la coloration visible, les sections sont rincées 3 fois 10min dans du PBS-MgCl₂ puis montées entre lame et lamelle.

Hybridation *in situ*

La localisation de l'ARN se fait grâce à une sonde couplée à la digoxigénine (DIG) (Roche). L'ajout d'un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche) suivi de l'ajout du substrat de cette enzyme, le BMPurple (Roche Ref : 11 442 074 001) permet de révéler la présence de la sonde par une coloration bleue.

-DISCUSSION-

Discussion

Dans cette partie de notre étude sur le rôle de *R-spondin1* dans la physiologie de l'ovaire post natal, nous avons utilisé deux modèles murins différents, le modèle d'inactivation du gène *R-spondin1* et le modèle de gain de fonction.

Il a été montré que *R-spondin1* joue un rôle majeur dans le développement gonadique embryonnaire. Dès le début du développement, elle intervient au niveau de la gonade bipotentielle où elle est importante pour la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique qui sont les cellules progénitrices des cellules de la gonade (Chassot et al., 2012). Dans cette étude les souris invalidées pour *R-spondin1* et *Wnt4*, montrent une prolifération réduite au niveau de l'épithélium cœlomique, ce qui conduit au développement d'un testicule hypoplasique chez les individus XY *Wnt4(-/-)*; *Rspo1(-/-)*. Plus tard, quand la gonade est engagée dans la voie de différenciation mâle ou femelle, le rôle de *R-spondin1* se restreint au développement ovarien, puisque les souris XX *Rspo1KO* présentent une inversion de sexe partielle (Chassot et al., 2008).

Son rôle dans les pathologies d'inversion sexuelle a également été démontré avec l'étude du modèle de double inactivation du gène *Sox9* et *R-spondin1* (Lavery et al., 2012). Il avait été démontré précédemment que les souris invalidées pour le gène *Sox9* de façon conditionnelle présentent une inversion de sexe des individus XY, avec une augmentation de l'expression de marqueurs ovariens dans les gonades de ces individus (Chaboissier et al., 2004). Dans ce modèle d'inversion de sexe de type femelle XY, il était considéré que la seule inactivation du gène *Sox9*, responsable de la différenciation mâle, est suffisante au développement de caractéristiques ovariennes chez ces mutants. L'étude du modèle de double inactivation de *Sox9* (inversion de sexe de type femelle XY) et de *R-spondin1* (inversion de sexe de type mâle XX) a permis cependant de mettre en évidence que l'expression du gène *R-spondin1* est responsable de l'expression de marqueurs de type ovarien et de la formation de follicules chez les mutants *Sox9cKO*. En son absence, les mutants *Sox9cKO* présentent une différenciation testiculaire, démontrant que *Sox9* n'est pas le seul effecteur de la différenciation mâle, du moins dans ces cas pathologiques (Lavery et al., 2012).

La troisième partie de ma thèse concerne le rôle de *R-spondin1* dans l'homéostasie tissulaire et le maintien de l'ovaire adulte. Pour cela, j'ai utilisé deux modèles murins, le modèle d'inactivation du gène *R-spondin1* dans les études d'inversion de sexe et le modèle de gain-de-fonction de *R-spondin1* dans l'ovaire.

Plusieurs points ont pu être mis en évidence grâce à l'étude du modèle d'inactivation. Le phénotype montre clairement, d'un point de vue macroscopique, que les ovaires des souris *Rspo1*KO sont de taille réduite par rapport aux ovaires contrôles. De plus, l'analyse histologique montre plusieurs anomalies : dans les ovaires où l'on retrouve des structures folliculaires normales, celles-ci sont très peu nombreuses contrairement aux ovaires de souris sauvages. Les quelques follicules sont le plus souvent dépourvus d'ovocytes, et forment donc de grandes cavités folliculaires. L'ESO est très souvent épaissi et constitué de plusieurs couches de cellules allongées, très différentes des cellules qui constituent l'ESO normal. Enfin ces souris peuvent être stériles et ce en fonction de leur fond génétique. Nous pouvons émettre deux explications/hypothèses afin d'expliquer ce phénotype :

- La première explication est que le phénotype observé chez les mutants *Rspo1*^{-/-} adultes serait dû à un défaut de différenciation des cellules de la granulosa au moment de la folliculogénèse. En effet, Chassot et al., 2012 a montré que *R-spondin1* avec *Wnt4* sont nécessaires à la prolifération des cellules de l'épithélium coelomique. Il n'est pas décrit si seule l'inactivation de *R-spondin1* peut suffire pour avoir le même phénotype de baisse de prolifération. Son rôle donc dans la formation des follicules de la première vague, ou follicules médullaires, n'est pas connu. Cependant, un peu avant la naissance, l'absence de *R-spondin1* conduit à un vieillissement accéléré qui peut aller jusqu'à l'inversion de sexe (Maatouk et al., 2013). Ceci indique que *R-spondin1* est un facteur primordial de la différenciation des cellules de la granulosa de la 2ème vague, décrite par Mork et al., 2012 et Zheng et al., 2014. Plus précisément, *R-spondin1* est nécessaire au maintien de l'état quiescent des cellules de la pré-granulosa. Le phénotype observé chez les *Rspo1*^{-/-} adultes est donc un phénotype partiellement voire complètement dû à l'anomalie de différenciation des cellules fœtales.

R-spondin1 est exprimé faiblement à partir de la naissance et jusqu'à l'âge

adulte au niveau de l'ESO et du cortex ovarien. Une grande partie de la folliculogénèse ovarienne a lieu à partir de la naissance chez la souris, même si ce processus est déjà commencé au stade embryonnaire (Zheng et al., 2014). Connaissant le rôle de *R-spondin1* dans la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique de la gonade bipotentielle (Chassot et al., 2012), on peut supposer qu'il est également important pour la prolifération des cellules de l'ESO qui vont migrer à l'intérieur de l'ovaire et former les follicules. Ceci expliquerait sa présence dans l'ESO et dans le cortex ovarien, après la naissance. En l'absence de *R-spondin1*, la folliculogénèse ne se déroulerait pas selon le modèle prévu, résultant dans la formation d'un nombre limité des follicules.

- Une deuxième hypothèse est que les souris invalidées pour le gène *R-spondin1* présentent des défauts de réparation de l'ESO après ovulation, en plus d'un défaut initial au niveau des cellules de la granulosa.. *R-spondin1* et *Axin2* étant exprimées dans l'ESO, il est probable que l'activation de la voie WNT/ β catenin soit nécessaire à la réparation de la rupture de l'ESO. D'autant plus que nous observons un épaississement de l'ESO chez les femelles *Rspo1*^{-/-} adultes, qui de monocouche chez les souris contrôles devient stratifié. Plus précisément, les cellules de l'ESO sont activées de façon transitoire et prolifèrent pour permettre la réparation de cet épithélium après les ruptures induites par l'ovulation (Osterholzer, Johnson, & Nicosia, 1985). Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans la réparation de l'ovaire ne soient pas connus, il est démontré que les cellules progénitrices sont à la base du renouvellement naturel d'un tissu et de sa réparation à la suite d'une lésion. La voie WNT/ β catenin est connue pour réguler l'équilibre entre état souche et état différencié des cellules progénitrices somatiques (Fodde & Brabletz, 2007). Il a ainsi été montré que dans le tissu neural cette voie de signalisation joue un rôle crucial dans le maintien de l'autorenouvellement et la prolifération des progéniteurs neuraux (Piccin & Morshead, 2011). De plus, il a été montré que la voie de signalisation WNT/ β catenin est activée dans l'épicardium, une autre partie du mésothélium qui recouvre le coeur, pour favoriser la réparation cardiaque lors d'une lésion (Duan et al., 2012). Ceci suggère que la signalisation WNT/ β catenin pourrait également être impliquée dans les processus de réparation d'autres organes recouverts par le mésothélium comme les ovaires. Il est à noter que la voie

WNT/ β catenin participe à la mobilisation des cellules souches de la peau lors de la cicatrisation cutanée (Whyte, Smith, & Helms, 2012), processus ressemblant aux différentes étapes de la réparation de l'ovaire (Kruk & Auersperg, 1992).

Nous avons observé cependant que chez les souris *Rspo1KO*, *Axin2* est exprimée au sein de l'ovaire, de façon similaire aux souris *Axin2/LacZ* contrôles. La question se pose donc de savoir comment l'expression d'*Axin2* est maintenue chez ces souris. Une hypothèse serait qu'en l'absence de *R-spondin1* dans l'ovaire adulte, un autre membre de la famille *R-spondin* pourrait la remplacer dans son rôle d'activateur de la voie WNT/ β catenin . Un candidat potentiel serait *R-spondin2*, puisqu'elle est également exprimée dans l'ovaire et que sa délétion induit une stérilité à l'âge d'environ 2 mois chez la souris (Bell et al., 2008). Une deuxième hypothèse est qu'un seul WNT suffise à activer la voie canonique dans l'ovaire adulte, puisqu'il a été montré que *Wnt4* est encore exprimé chez la souris adulte (Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2014). Une autre question que soulève ce résultat est de savoir à quoi est dû le phénotype observé chez nos mutants *Rspo1KO*, puisque la voie canonique WNT/ β catenin reste activée. Ceci pourrait tout d'abord s'expliquer par le fait que *R-spondin1* ne soit pas nécessaire dans l'ovaire post natal, au delà de la folliculogénèse et que le phénotype que l'on observe résulte seulement de défauts de ce processus. Une autre explication serait que le rôle de *R-spondin1* dans le maintien de l'ovaire adulte passe par l'activation d'une voie *Wnt* non-canonique. Il a été démontré dans la littérature que *R-spondin3* peut se lier au récepteur syndecan 4 (*Sdc4*) et induire la voie de signalisation *Wnt/PCP* afin de promouvoir la morphogénèse chez le Xénope (Ohkawara et al., 2011). Cependant aucun phénotype ovarien n'a été observé chez les souris *Sdc4*^{-/-}.

Nos résultats concernant le modèle d'invalidation de *R-spondin1* présentent des limites. Tout d'abord, comme décrit précédemment, le rôle de *R-spondin1* est prépondérant dans la différenciation ovarienne au stade embryonnaire (Chassot et al., 2008). Néanmoins, chez la souris, les phénotypes d'inversion de sexe sont sensibles au fond génétique. Dans le fond génétique que nous avons étudié, le phénotype d'inversion de sexe chez les individus *Rspo1KO* ne concerne pas 100% des individus. Certains d'entre eux se développent en tant que femelles et dans plusieurs cas, on observe le développement d'ovotestis. Cependant, l'invalidation du

gène *R-spondin1* au stade embryonnaire implique certainement des défauts de développement ovarien même en l'absence d'inversion de sexe. Il est donc indispensable de valider ces résultats préliminaires avec un modèle de souris où *R-spondin1* sera flanqué de deux sites *LoxP*. Le croisement de ces souris avec une lignée *Cre* inductible permettra l'invalidation de ce gène à des stades où la détermination sexuelle et/ou la folliculogénèse sont terminées, ce qui permettra d'évaluer son rôle dans un ovaire formé normalement. Nous pourrons ainsi par la suite évaluer plus précisément le rôle de *R-spondin1* dans la folliculogénèse, ainsi que dans les processus d'ovulation et de réparation à chaque cycle ovulatoire, si celui-ci est présent. Ceci permettra de déterminer de façon plus sûre le rôle de *R-spondin1* dans l'homéostasie tissulaire de l'ovaire, chez la souris.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le modèle murin d'expression ectopique de *R-spondin1* dans l'ovaire. Dans ce modèle l'expression de *R-spondin1*, qui est inséré dans le locus de *Rosa26*, est induite dans les tissus stéroïdogènes et l'ovaire après croisement de la lignée *R26^{Rspo1/+}* avec la *Sf1:Cre*. L'expression de *R-spondin1* dans l'ovaire adulte étant plutôt faible en temps normal, nous avons étudié ce que pouvait induire le maintien de son expression au niveau de l'homéostasie de l'ovaire adulte. L'apparition du phénotype commence à être visible d'un point de vue histologique à partir de P28, où l'on observe un plus grand nombre de follicules pré-antraux en comparaison aux ovaires de souris contrôles. A P40, on constate que de nombreux follicules anormaux sont dépourvus d'ovocyte. L'analyse d'ovaires de souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* âgées de plus d'un an nous a permis d'observer que ces structures folliculaires anormales ne disparaissent pas avec le temps, comme on aurait pu le penser du fait qu' ils soient dépourvus d'ovocytes. Pour cette raison, ces structures devraient entrer en atresie puis disparaître. Contrairement à cela, elles ne prolifèrent pas et n'entrent pas en apoptose, comme nous avons pu le montrer. Après avoir étudié la nature de ces structures folliculaires anormales, nous avons démontré qu'elles sont constituées de cellules de type granulosa qui gardent cependant des caractéristiques épithéliales des cellules de l'ESO, dont elles proviennent. Ainsi, l'expression de *R-spondin1* dans l'ovaire adulte mène à l'apparition de structures folliculaires anormales, dont les cellules semblent avoir une double identité, celles de cellules de la granulosa et celles de cellules de l'ESO. La

baisse du niveau d'expression de *R-spondin1* semble donc nécessaire à la différenciation normale des cellules de la granulosa. Ceci se confirme par le fait que, dans la gonade embryonnaire, *R-spondin1* maintient le statut des cellules somatiques au stade de cellules de la pré-granulosa. Celles-ci se différencient en cellules de la granulosa après la baisse du niveau d'expression de *R-spondin1* (Maatouk et al., 2013). Dans les ovaires de souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}* ; *Sf1:Cre* en revanche, cette baisse du niveau d'expression de *R-spondin1* n'a pas lieu, ce qui semble maintenir les cellules de la granulosa à un stade précurseur. Comme les cellules de la granulosa proviennent de l'ESO durant la folliculogénèse (Zheng et al., 2014 ; Mork et al., 2012), elles pourraient garder certaines de leurs caractéristiques puisqu'elles ne parviennent pas à se différencier en cellules de la granulosa matures. Les structures folliculaires anormales seraient donc des follicules dont les cellules somatiques ne sont pas différenciées correctement.

Nous avons essayé par la suite de déterminer la cause de l'augmentation du nombre de follicules anormaux. Nos résultats montrent qu'à la naissance, les ovaires contrôles et les ovaires de souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}* ; *Sf1:Cre* contiennent le même nombre d'ovocytes et de cellules pré-granulosa. En revanche, à P8, moment où la folliculogénèse est terminée, on observe une diminution d'ovocytes dans les ovaires XX *Rosa26^{Rspo1/+}* ; *Sf1:Cre*. Cette diminution, qui reste à confirmer, se traduit par une absence complète d'ovocytes dans ces structures dès 40 jours après la naissance. Cette disparition des ovocytes est probablement due à l'immaturité des cellules somatiques qui sont responsables du développement ovocytaire. En absence d'un environnement somatique normal, les ovocytes entrent en apoptose. Par la suite, les follicules anormaux dépourvus de leurs ovocytes devraient entrer en atresie pour ensuite disparaître. Ils restent cependant quiescents au sein de l'ovaire, suggérant que la signalisation de *R-spondin1* les empêche de disparaître. Elle serait dans ce cas là un facteur de survie des cellules de la granulosa.

Nous avons également observé la désorganisation des structures folliculaires anormales au niveau des cellules de la granulosa mais aussi des cellules de la thèque. En tenant compte du fait que ces structures expriment très fortement la β catenin à la surface de leurs cellules, et que les récepteurs *Lgr4* et *Lgr5* ne sont présents que dans les corps jaunes des ovaires normaux, nous pouvons supposer que la signalisation de *R-spondin1* dans les follicules passe par une voie *Wnt* non-canonique telle que la voie

PCP. Ceci perturberait la polarité des cellules de la granulosa conduisant à une désorganisation de celles-ci comme nous l'avons observé. Cependant, le fait qu'Axin2 soit activée dans les structures folliculaires anormales, suggère plutôt que la signalisation due à *R-spondin1* dans ces structures, passe par un autre récepteur capable d'activer la voie canonique. La *βcatenin* peut également être impliquée dans l'adhésion cellulaire, comme mentionné précédemment. Nous pouvons supposer que la désorganisation des cellules folliculaires suite à une dérégulation de leur polarité pourrait induire des changements au niveau des jonctions cellulaires de ces cellules, expliquant le fort marquage de *βcatenin* à leur surface. Une adhésion cellulaire excessive pourrait peut-être aussi être la cause du maintien de ces structures au sein de ces ovaires.

En ce qui concerne la formation de kystes ovariens remplis de sang, il semblerait d'après nos résultats que cela pourrait être lié à l'ovulation. Comme le modèle d'inactivation du gène *R-spondin1*, les ovaires des souris XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* pourraient avoir un défaut de réparation de l'ESO après ovulation. Dans ce cas là cependant, le problème s'expliquerait plus par une prolifération excessive de l'ESO après sa rupture. Ceci concorderait avec le rôle de *R-spondin1* dans la prolifération des cellules somatiques au stade de la gonade bipotentielle (Chassot et al., 2012). Le rôle mitogène de *R-spondin1* a également été démontré dans les cellules épithéliales de l'intestin (Ootani et al., 2009)(K.-A. Kim et al., 2005) et des cellules germinales de l'ovaire (Chassot et al., 2011).

Enfin, en ce qui concerne l'apparition de cancers ovariens chez les individus âgés de plus de douze mois, plusieurs questions se posent. Tout d'abord, comme décrit dans l'introduction, les cancers ovariens sont divisés en plusieurs groupes en fonction principalement du type cellulaire à l'origine de la tumeur. Les tumeurs d'origine épithéliale, qui proviendraient de l'ESO, présentent le pourcentage d'apparition le plus élevé, puis viennent ensuite les cancers ovariens d'origine folliculaire, puis ceux d'origine germinale. Bien que la cause de ces tumeurs ne soit pas clairement définie, l'utilisation de différents modèles murins a permis l'identification de plusieurs gènes impliqués dans cette tumorigenèse (Mullany & Richards, 2012). Parmi ceux-ci, la voie de signalisation *βcatenin* qui est connue pour être responsable du développement de divers cancers (Klaus & Birchmeier, 2008), semble directement liée à ce phénomène. Cette voie est fortement activée dans

certaines tumeurs des cellules folliculaires (granulosa) (Boerboom et al., 2005), et favorise l'apparition d'adénocarcinome endométrioïde ovarien (Rong Wu et al., 2007).

Dans quelle catégorie se situent les tumeurs développées chez certains individus XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* ? D'après nos résultats elles pourraient principalement se développer à partir des cellules de la granulosa des follicules anormaux. Ces cellules n'étant pas différenciées correctement, pourraient, à un moment, se dé-différencier complètement pour se re-différencier ensuite en d'autres types cellulaires. Ceci pourrait expliquer le fait que des érythrocytes aient été observés dans plusieurs structures apparentes à des corps jaunes. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de défaut de vascularisation dans les ovaires XX *Rosa26^{Rspo1/+}; Sf1:Cre* suggérant une infiltration érythrocytaire au sein de ces structures. Ces érythrocytes pourraient provenir donc de cellules qui se sont différenciées au sein de l'ovaire. L'hypothèse que les tumeurs se développent à partir des cellules de la granulosa est appuyée par une étude effectuée sur un modèle d'expression ectopique de *βcatenin* dans l'ovaire, *Catnblox(Ex3)/+; Amhr2:Cre* (Boerboom et al., 2005). Les ovaires de ces souris développent plusieurs lésions pré-tumorales similaires aux structures folliculaires décrites dans notre modèle. L'expression de *βcatenin* dans ces structures est localisée à la membrane, comme dans notre cas, mais aussi dans le noyau des cellules. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le modèle étudié par Boerboom et al., 2005 stabilise une forme très active de la *βcatenin* dans la cellule. Ceci expliquerait également la différence de prévalence de ces tumeurs entre ces deux modèles puisque les souris *Catnblox(Ex3)/+; Amhr2:Cre* développent toutes des tumeurs ovariennes.

Etant donné cependant le patron d'expression de deux récepteurs connus de *R-spondin1* dans l'ovaire, *Lgr4* et *Lgr5*, nous pouvons penser également que les cancers qui apparaissent dans notre modèle proviennent des corps jaunes, puisque c'est là principalement que sont présents les récepteurs de *R-spondin1*. Une autre possibilité serait que les tumeurs proviennent de l'ESO qui suite à l'ovulation, proliférerait de façon aberrante, sous l'action mitogénique de *R-spondin1*.

Dans tous les cas, une étude plus approfondie des tumeurs développées devrait nous permettre de déterminer leur origine cellulaire. Parallèlement, l'étude de tumeurs ovariennes humaines pour l'expression de *R-spondin1* permettrait de

consolider son rôle oncogénique dans l'ovaire. De plus, l'utilisation d'une lignée *Cre* telle que *l'Amhr2:Cre* nous permettrait d'induire l'expression ectopique de *R-spondin1* seulement dans les cellules de granulosa de l'ovaire. Un phénotype similaire à celui que nous avons déjà observé démontrerait que les anomalies observées dans ces ovaires, ainsi que l'apparition des tumeurs, proviendraient des cellules de la granulosa. Enfin, des analyses transcriptomiques des ovaires contrôles versus des ovaires *Rosa26^{Rspo1/+} ; Sf1:Cre* à différents stades de la progression du phénotype permettront d'identifier les voies génétiques dérégulées au cours du développement de ces tumeurs.

En conclusion, cette étude nous a permis de mettre en évidence le rôle important de *R-spondin1* dans la physiologie de l'ovaire adulte puisque son inactivation, ainsi que son expression maintenue induisent des phénotypes très marqués. L'implication directe de ce gène dans le dysfonctionnement de l'ovaire et l'apparition de tumeurs ovariennes n'avait jamais été démontrée jusqu'à présent et on pourrait espérer que *R-spondin1* puisse un jour servir de marqueur éventuel dans le dépistage précoce des cancer ovariens. Enfin, nous avons mis en évidence que la voie de signalisation de *R-spondin1* doit être régulée de façon très précise chez l'adulte, de la même façon qu'au stade embryonnaire durant la détermination sexuelle.

**DISCUSSION
-GENERALE ET-
PERSPECTIVES**

Discussion générale et perspectives

Mon travail de thèse consiste à étudier le rôle de *R-spondin1* et *Sox9*, deux gènes clefs de la détermination du sexe dont l'absence de régulation conduit à des processus d'inversion de sexe, ainsi que le rôle de *R-spondin1* dans la physiologie de l'ovaire adulte.

Chez l'homme, les mutations hétérozygotes de SOX9 résultent en inversion de sexe chez la grande majorité des patients XY (Houston et al., 1983). L'inactivation complète du gène *Sox9* conduit à une létalité périnatale, même à l'état d'hétérozygotie (Bi et al., 1999). La différenciation des testicules est normale et la létalité de ces animaux empêche de générer des animaux *Sox9*^{-/-} afin d'analyser si *Sox9* est nécessaire au développement des gonades. Tous les modèles d'inactivation conditionnelle des deux allèles de *Sox9* dans les gonades (Chaboissier et al, 2004 ; Barrinuevo et al., 2006) ont montré que *Sox9* est nécessaire à la différenciation des cellules de Sertoli et au développement testiculaire. Cependant dans tous ces modèles, l'ablation de *Sox9* n'est pas restreinte aux gonades entraînant la létalité de ces mutants avant la puberté. Dans une première partie de ma thèse, j'ai contribué à l'établissement d'un modèle d'inactivation conditionnelle du gène *Sox9* en utilisant la lignée *Sox9*^{flox/flox} (Akiyama et al., 2002). Le croisement de cette lignée *Sox9*^{flox/flox} avec le modèle murin *Sf1:Cre* (Bingham et al., 2006) a permis d'invalider *Sox9* dans les gonades, la glande surrénale et l'hypophyse. Nous avons montré que les gonades des individus XY *Sox9*^{CKO} se développent en ovaires capables de produire des ovocytes fertiles qui se développent jusqu'au stade 2 cellules (Lavery et al., 2011). *Sox9* est donc l'acteur principal nécessaire et suffisant à la différenciation des testicules et au développement mâle.

Nous avons ensuite évalué le rôle de *Sox9* dans l'inversion de sexe observée chez les individus XX *Rspo1*^{-/-} (*Rspo1*^{CKO}). L'étude du modèle murin d'inactivation de *R-spondin1* généré au laboratoire a montré que les individus XX *Rspo1*^{-/-} développent des gonades hypoplasiques contrairement aux individus contrôles. Ces gonades contiennent dans la plupart des cas des structures caractéristiques du testicule, telles que des cordons séminifères composés de cellules de Sertoli (Chassot et al., 2008). L'inversion de sexe observée apparaît de façon concomitante avec l'expression de marqueurs spécifiques du testicule, tels que *Sox9* et sa cible directe, *Amh*. Ces résultats

suggèrent que SOX9 est responsable de l'inversion de sexe dans les gonades XX *Rspo1KO*.

Si *Sox9* est le facteur initiateur de l'inversion de sexe, on peut donc penser que l'ablation de ce gène empêche la différenciation testiculaire dans les gonades XX *Rspo1^{-/-}*. De façon inattendue, nous avons observé des cordons testiculaires dans les gonades XX et XY *Rspo1^{KO};Sox9^{CKO}*. Cela indique que le développement de structures testiculaires et par conséquent l'inversion de sexe peut avoir lieu en l'absence de *Sry* et de *Sox9*.

L'expression de *Sox8* et *Sox10* chez les individus XX *Rspo1^{KO};Sox9^{CKO}* et XY *Rspo1^{KO};Sox9^{CKO}* suggère qu'ils sont éventuellement responsables de la différenciation testiculaire observée en l'absence de *Sox9*. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'expression ectopique de *Sox10* chez des individus XX induit une différenciation testiculaire (Polanco et al., 2010). Cependant aucun rôle de *Sox10* n'a été décrit dans le développement testiculaire (Britsch et al., 2001; Pingault et al., 1998). *Sox8* a été montré comme renforçant la masculinisation des gonades grâce à des études de double invalidation de *Sox8* et *Sox9* (Chaboissier et al., 2004). Les souris *Sox8^{KO}* présentent un défaut de spermatogenèse conduisant à la stérilité à l'âge de 5 mois (O'Bryan et al., 2008; Singh, Cummings, Mishina, & Archer, 2013)(O'Bryan et al, 2008; Singh et al, 2013.). L'invalidation constitutive de *Sox8* et l'ablation conditionnelle de *Sox9* à 14.5 *jpc* résulte en un phénotype plus sévère que celui du à l'ablation d'un seul gène. A 17.5 *jpc*, les gonades XY *Sox8^{KO};Sox9^{CKO}* montrent une transdifférenciation des cellules de Sertoli, un nombre réduit de cordons sexuels et leur désintégration due à des anomalies de la lame basale (Barrionuevo et al, 2009; Georg et al, 2012). Cela indique que *Sox8* et *Sox9* sont fonctionnellement redondants durant la période fœtale. Il se pourrait donc qu'en l'absence de *Sox9*, *Sox8* puisse compenser cette absence et induire la différenciation testiculaire chez les doubles mutants *Rspo1^{KO};Sox9^{CKO}*. Afin d'élucider ce point, il serait intéressant de poursuivre l'étude en générant des souris mutantes pour ces gènes (*R-spondin1*, *Sox9* et *Sox8/Sox10*) et regarder si la différenciation testiculaire est compromise. De plus, il serait intéressant de savoir comment est activé *Sox8* et/ou *Sox10* en l'absence de *Sox9*, puisque l'expression de *Sox8* se situe en aval de *Sox9* (Chaboissier et al., 2004 ; Barrionuevo et al., 2008) et *Sox8* et *Sox9* contrôlent l'expression de *Sox10* (Georg et al., 2012).

De plus, les gonades XY *Rspo1^{KO};Sox9^{CKO}* se développent en testicules hypoplasiques démontrant le rôle essentiel de *Rspo1* pour la différenciation ovarienne observée chez les individus XY *Sox9^{CKO}*. Ceci signifie que la voie de différenciation femelle est une voie qui doit être activée afin de permettre la différenciation ovarienne, contrairement à ce qu'il était jusqu'à présent admis dans le domaine. Nous avons donc proposé un nouveau modèle pour la détermination du sexe chez la souris qui ne considère plus la voie de différenciation ovarienne comme une voie par défaut, mais plutôt comme une voie qui doit être activement induite par *R-spondin1*. Ainsi, la détermination du sexe peut être considérée comme une balance entre la voie de signalisation mâle activée par les *Sox* et la voie de signalisation femelle activée par *R-spondin1*.

Etonnement, l'inversion de sexe chez les individus XX *Rspo1^{KO}* survient assez tardivement (16,5 *jpc*) comparé à l'âge de la détermination du sexe (11,5 *jpc*). En effet, chez la souris mâle, *Sry* commence à être exprimé à 10*jpc*, avec un pic d'expression situé à 11,5*jpc*. Son expression induit l'activation de *Sox9* à 11,5*jpc* qui par la suite active d'autres gènes cibles tels que *Amh* et *Fgf9* conduisant au développement testiculaire. Chez les souris XX *Rspo1^{KO}* et XX *Wnt4^{KO}*, le processus d'inversion de sexe débute vers 16,5 *jpc*-17,5 *jpc.*, c'est-à-dire après le stade de la détermination du sexe (Maatouk et al., 2013). Les cellules de la pré-granulosa entrent en prolifération, se différencient en cellules de la granulosa de façon anormalement précoce, puis se trans-différencient en cellules de Sertoli. L'ablation des cellules germinales par un traitement au busulfan empêche la reprise de la prolifération, la différenciation anormale précoce et la trans-différenciation des cellules de la pré-granulosa des gonades XX *Rspo1^{KO}* et XX *Wnt4^{KO}*. Ces résultats suggèrent que l'invalidation de *Rspo1* ou *Wnt4* affecte les cellules germinales qui secrètent un signal initiant les processus conduisant à l'inversion de sexe. Il faut noter que les cellules germinales se différencient anormalement chez les mutants XX *Rspo1^{KO}* et présentent des caractéristiques soit de cellules germinales primordiales comme l'expression maintenue d'*Oct4* soit de pré-spermatogonies comme l'expression de *Nanos2* (Chassot et al., 2011). On peut donc faire l'hypothèse que les cellules germinales des gonades XX *Rspo1^{KO}* secrètent un signal favorisant l'inversion de sexe. L'identité de ce signal reste à élucider. Dans les gonades XX *Wnt4^{KO}*, les cellules germinales présentent

également une différenciation anormale (Naillat et al., 2010). Cependant, la plupart de ces cellules dégèrent par apoptose à 15,5-16,5jpc. De ce fait, le signal masculinisant sécrété par les cellules germinales doit être produit avant ce stade. Tous ces résultats suggèrent que les ovocytes sont importants au maintien des cellules de la granulosa à un stade indifférencié.

R-spondin1 est nécessaire à la différenciation ovarienne au stade embryonnaire. Son absence conduit à la différenciation précoce des cellules de pré-granulosa en cellules de la granulosa avant qu'elles se transdifférencient en cellules de Sertoli (Maatouk et al. 2013). Cela suggère que RSPO1 est un facteur du maintien de l'état non différencié des cellules de pré-granulosa. Sachant que l'expression de *R-spondin1* dans l'ovaire diminue de façon très significative après la naissance, nous avons étudié l'impact que pouvait avoir le maintien de son expression tout au long de la vie adulte. Dans le modèle de gain-de-fonction de l'expression de *R-spondin1*, l'expression de ce gène est maintenue dans l'ovaire adulte et induit l'expression d'*Axin2*, un marqueur de l'activation de la voie de signalisation WNT/ β catenin (Lustig et al., 2002). Les ovaires de ces souris présentent un grand nombre de structures folliculaires anormales. Les cellules qui constituent ces structures expriment FOXL2 et sont donc des cellules de la granulosa. Cependant, ces cellules expriment également des marqueurs épithéliaux de leurs cellules progénitrices qui sont localisées dans l'épithélium de surface ovarien. Cela suggère que le maintien de l'expression de *R-spondin1* empêche ces cellules de se différencier en cellules de la granulosa mature. De ce fait, l'expression de *R-spondin1* doit être transitoire afin de permettre la différenciation normale des cellules de la granulosa. De plus l'expression de *R-spondin1* semble empêcher l'atrésie folliculaire qui est un processus normal de l'ovaire visant à éliminer une grande partie des follicules anormaux, dont certains qui ne seront pas amenés à ovuler.

L'étude de l'activation constitutive de β catenin dans l'ovaire montre l'apparition de structures folliculaires anormales similaires à celle observées dans notre modèle (Boerboom et al., 2008). Ces structures évoluent rapidement en tumeurs des cellules de la granulosa. Chez le mutant de gain-de-fonction de *R-spondin1*, l'apparition de tumeurs ovariennes est plus tardive et l'incidence de ces tumeurs est faible. Cette différence au niveau de l'apparition et la sévérité du phénotype pourrait s'expliquer par le fait que dans le modèle de gain-de-fonction de *R-spondin1*, nous observons une

baisse d'expression d'*Axin2* au sein des structures folliculaires anormales. De plus, nous observons la présence d'un signal β catenin membranaire au sein de ces structures. Cela montre que la voie WNT/ β catenin canonique s'éteint dans ces structures folliculaires anormales au profit de β catenin comme acteur de l'adhésion cellulaire. Les structures folliculaires anormales observées dans notre modèle restent cependant une source possible de l'apparition des tumeurs. Une étude anatomopathologique en collaboration avec le Dr. Ambrosetti, nous permettra d'évaluer ce point.

Nous avons également observé un nombre accru de kystes sanguins après induction de l'ovulation dans les ovaires des souris gain-de-fonction de *R-spondin1*. Cela montre que l'expression de *R-spondin1* favorise l'apparition de kystes après ovulation. L'analyse histologique révèle qu'un grand nombre de kystes remplis de sang sont associés à des corps jaunes. De plus, nous avons observé la présence d'un ovocyte dans les kystes sanguins. Cependant cela a lieu rarement. Cela suggère que l'expulsion de l'ovocyte peut être affectée au moment de l'ovulation, peut-être à cause d'un défaut au niveau de la rupture de l'épithélium de surface ovarien. De plus, dans les gonades de ces mutants n'ayant pas subi de superovulations, nous avons remarqué fréquemment une infiltration érythrocytaire dans les corps jaune. Cela suggère que les kystes sanguins observés lors de la superovulation résultent d'un dysfonctionnement du corps jaune. Pour vérifier cela il est possible de procéder à des expériences de superovulation et de comptage ensuite des ovocytes expulsés. En l'absence de ceux-ci des coupes sérielles des ovaires permettra de visualiser si les ovocytes sont maintenus à l'intérieur des kystes sanguins. Finalement des marquages immunologiques devraient nous permettre d'identifier la nature des cellules formant les kystes.

En conclusion, notre étude montre que la détermination du sexe ainsi que l'homéostasie de l'ovaire adulte doivent être finement régulées durant tous les stades de la vie de l'individu puisque des dérégulations de ses gènes clefs, comme le gène *R-spondin1*, mènent à l'apparition de diverses pathologies, telles que les inversions de sexe et plusieurs pathologies de l'ovaire adulte telles que les tumeurs ovariennes.

**-REFERENCES-
BIBLIOGRAPHIQUES**

Références Bibliographiques

- Abel, M. H., Wootton, A. N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P. G., & Charlton, H. M. (2000). The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*, *141*(5), 1795–803. doi:10.1210/endo.141.5.7456
- Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Martin, J. F., Schedl, A., & de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Development*, *16*(21), 2813–28. doi:10.1101/gad.1017802
- Albrecht, K. H., & Eicher, E. M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental Biology*, *240*(1), 92–107. doi:10.1006/dbio.2001.0438
- Aoki, M., Mieda, M., Ikeda, T., Hamada, Y., Nakamura, H., & Okamoto, H. (2007). R-spondin3 is required for mouse placental development. *Developmental Biology*, *301*(1), 218–26. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.018
- Aoki, M., Kiyonari, H., Nakamura, H., & Okamoto, H. (2008). R-spondin2 expression in the apical ectodermal ridge is essential for outgrowth and patterning in mouse limb development. *Development, Growth & Differentiation*, *50*(2), 85–95. doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00978.x
- Arango, N. A., Lovell-Badge, R., & Behringer, R. R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*, *99*(4), 409–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10571183>
- Archambeault, D. R., & Yao, H. H.-C. (2010). Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(23), 10526–31. doi:10.1073/pnas.1000318107
- Auersperg, N. (2011). The origin of ovarian carcinomas: a unifying hypothesis. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, *30*(1), 12–21. doi:10.1097/PGP.0b013e3181f45f3e
- Auguste, A., Chassot, A.-A., Grégoire, E. P., Renault, L., Pannetier, M., Treier, M., ... Chaboissier, M.-C. (2011). Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, *5*(6), 304–17. doi:10.1159/000334517
- Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Jayakody, I., Taketo, M. M., Scherer, G., & Harley, V. R. (2008). Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Developmental Biology*, *314*(1), 71–83. doi:10.1016/j.ydbio.2007.11.010
- Baker, S. J., & Spears, N. (n.d.). The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Human Reproduction Update*, *5*(2), 153–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10336019>

- Baran, R., & Kechijian, P. (n.d.). Understanding nail disorders. *European Journal of Dermatology: EJD*, *11*(2), 159–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11275819>
- Barker, N., van Es, J. H., Jaks, V., Kasper, M., Snippert, H., Toftgård, R., & Clevers, H. (2008). Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling Lgr5+ve stem cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *73*, 351–6. doi:10.1101/sqb.2008.72.003
- Barrionuevo, F., Georg, I., Scherthan, H., Lécureuil, C., Guillou, F., Wegner, M., & Scherer, G. (2009). Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Developmental Biology*, *327*(2), 301–12. doi:10.1016/j.ydbio.2008.12.011
- Beamer, W. G., Hoppe, P. C., & Whitten, W. K. (1985). Spontaneous malignant granulosa cell tumors in ovaries of young SWR mice. *Cancer Research*, *45*(11 Pt 2), 5575–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4053032>
- Bell, S. M., Schreiner, C. M., Wert, S. E., Mucenski, M. L., Scott, W. J., & Whitsett, J. A. (2008). R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *135*(6), 1049–58. doi:10.1242/dev.013359
- Bernard, D. J., & Woodruff, T. K. (2001). Inhibin binding protein in rats: alternative transcripts and regulation in the pituitary across the estrous cycle. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *15*(4), 654–67. doi:10.1210/mend.15.4.0630
- Bernard, P., Ryan, J., Sim, H., Czech, D. P., Sinclair, A. H., Koopman, P., & Harley, V. R. (2012). Wnt signaling in ovarian development inhibits Sfl activation of Sox9 via the Tesco enhancer. *Endocrinology*, *153*(2), 901–12. doi:10.1210/en.2011-1347
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, *22*(1), 85–9. doi:10.1038/8792
- Bingham, N. C., Verma-Kurvari, S., Parada, L. F., & Parker, K. L. (2006). Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, *44*(9), 419–24. doi:10.1002/dvg.20231
- Bishop, C. E., Whitworth, D. J., Qin, Y., Agoulnik, A. I., Agoulnik, I. U., Harrison, W. R., ... Overbeek, P. A. (2000). A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nature Genetics*, *26*(4), 490–4. doi:10.1038/82652
- Blaydon, D. C., Ishii, Y., O'Toole, E. A., Unsworth, H. C., Teh, M.-T., Rüschenhoff, F., ... Kellsell, D. P. (2006). The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. *Nature Genetics*, *38*(11), 1245–7. doi:10.1038/ng1883
- Borycki, A. G., & Emerson, C. P. (2000). Study of skeletal myogenesis in cultures of unsegmented paraxial mesoderm. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *137*, 351–7. doi:10.1385/1-59259-066-7:351
- Bouilly, J., Veitia, R. A., & Binart, N. (2014). NOBOX is a key FOXL2 partner involved in ovarian folliculogenesis. *Journal of Molecular Cell Biology*, *6*(2), 175–7. doi:10.1093/jmcb/mju006
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., ... Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5773), 596–600. doi:10.1126/science.1125691

- Braw-Tal, R., McNatty, K. P., Smith, P., Heath, D. A., Hudson, N. L., Phillips, D. J., ... Davis, G. H. (1993). Ovaries of ewes homozygous for the X-linked Inverdale gene (*FecXI*) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. *Biology of Reproduction*, 49(5), 895–907. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8286585>
- Britsch, S., Goerich, D. E., Riethmacher, D., Peirano, R. I., Rossner, M., Nave, K. A., ... Wegner, M. (2001). The transcription factor *Sox10* is a key regulator of peripheral glial development. *Genes & Development*, 15(1), 66–78. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=312607&tool=pmcentrez&render_type=abstract
- Brüchle, N. O., Frank, J., Frank, V., Senderek, J., Akar, A., Koc, E., ... Bergmann, C. (2008). *RSPO4* is the major gene in autosomal-recessive anonychia and mutations cluster in the furin-like cysteine-rich domains of the Wnt signaling ligand R-spondin 4. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(4), 791–6. doi:10.1038/sj.jid.5701088
- Cadiou, E., Neff, M. W., Quignon, P., Walsh, K., Chase, K., Parker, H. G., ... Ostrander, E. A. (2009). Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5949), 150–3. doi:10.1126/science.1177808
- Carmon, K. S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., & Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors *LGR4* and *LGR5* to regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11452–7. doi:10.1073/pnas.1106083108
- Chaboissier, M.-C., Kobayashi, A., Vidal, V. I. P., Lützkendorf, S., van de Kant, H. J. G., Wegner, M., ... Schedl, A. (2004). Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 131(9), 1891–901. doi:10.1242/dev.01087
- Chadi, S., Buscara, L., Pechoux, C., Costa, J., Laubier, J., Chaboissier, M.-C., ... Le Provost, F. (2009). *R-spondin1* is required for normal epithelial morphogenesis during mammary gland development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 1040–3. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.104
- Chahal, J. K., Wong, V. S. C., Chaboissier, M.-C., & Brubaker, P. L. (2014). *R-spondin1* deficiency enhances β -Cell neogenesis in a murine model of diabetes. *Pancreas*, 43(1), 93–102. doi:10.1097/MPA.0b013e3182a70bfb
- Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E. P., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., ... Chaboissier, M.-C. (2008). Activation of β -catenin signaling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary. *Human Molecular Genetics*, 17(9), 1264–77. doi:10.1093/hmg/ddn016
- Chassot, A.-A., Gregoire, E. P., Lavery, R., Taketo, M. M., de Rooij, D. G., Adams, I. R., & Chaboissier, M.-C. (2011). *RSPO1*/ β -catenin signaling pathway regulates oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PloS One*, 6(10), e25641. doi:10.1371/journal.pone.0025641
- Chassot, A.-A., Bradford, S. T., Auguste, A., Gregoire, E. P., Pailhoux, E., de Rooij, D. G., ... Chaboissier, M.-C. (2012). *WNT4* and *RSPO1* together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development (Cambridge, England)*, 139(23), 4461–72. doi:10.1242/dev.078972

- Chen, J.-Z., Wang, S., Tang, R., Yang, Q.-S., Zhao, E., Chao, Y., ... Mao, Y.-M. (2002). Cloning and identification of a cDNA that encodes a novel human protein with thrombospondin type I repeat domain, hPWTSR. *Molecular Biology Reports*, 29(3), 287–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12463421>
- Chua, A. W. C., Ma, D., Gan, S. U., Fu, Z., Han, H. C., Song, C., ... Phan, T. T. (2011). The role of R-spondin2 in keratinocyte proliferation and epidermal thickening in keloid scarring. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(3), 644–54. doi:10.1038/jid.2010.371
- Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., & Hsueh, A. J. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137(4), 1447–56. doi:10.1210/endo.137.4.8625923
- Colombo, N., Parma, G., Zanagnolo, V., & Insinga, A. (2007). Management of ovarian stromal cell tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(20), 2944–51. doi:10.1200/JCO.2007.11.1005
- Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., & Ornitz, D. M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, 104(6), 875–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11290325>
- Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., & Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology*, 326(1), 112–20. doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.040
- Cossu, G., & Borello, U. (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *The EMBO Journal*, 18(24), 6867–72. doi:10.1093/emboj/18.24.6867
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., ... Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*, 27(2), 159–66. doi:10.1038/84781
- De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(10), 745–56. doi:10.1093/abbs/gmr079
- De Lau, W., Barker, N., Low, T. Y., Koo, B.-K., Li, V. S. W., Teunissen, H., ... Clevers, H. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 476(7360), 293–7. doi:10.1038/nature10337
- De Lau, W. B. M., Snel, B., & Clevers, H. C. (2012). The R-spondin protein family. *Genome Biology*, 13(3), 242. doi:10.1186/gb-2012-13-3-242
- De Lau, W., Peng, W. C., Gros, P., & Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & Development*, 28(4), 305–16. doi:10.1101/gad.235473.113
- DeFalco, T., Takahashi, S., & Capel, B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Developmental Biology*, 352(1), 14–26. doi:10.1016/j.ydbio.2011.01.011
- Denny, P., Swift, S., Connor, F., & Ashworth, A. (1992). An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *The EMBO Journal*, 11(10), 3705–12. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=556830&tool=pmcentrez&render type=abstract>

- Diaz, F. J., Wigglesworth, K., & Eppig, J. J. (2007). Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. *Developmental Biology*, *305*(1), 300–11. doi:10.1016/j.ydbio.2007.02.019
- Duan, J., Gherghe, C., Liu, D., Hamlett, E., Srikantha, L., Rodgers, L., ... Deb, A. (2012). Wnt1/ β catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *The EMBO Journal*, *31*(2), 429–42. doi:10.1038/emboj.2011.418
- Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., ... Themmen, A. P. N. (2002). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, *143*(3), 1076–84. doi:10.1210/endo.143.3.8691
- Durlinger, A. L. L., Visser, J. A., & Themmen, A. P. N. (2002). Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction (Cambridge, England)*, *124*(5), 601–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12416998>
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, *30*(6), 624–712. doi:10.1210/er.2009-0012
- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., & Matzuk, M. M. (1999). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *13*(6), 1018–34. doi:10.1210/mend.13.6.0309
- Emori, C., & Sugiura, K. (2014). Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, *85*(6), 627–33. doi:10.1111/asj.12200
- Eppig, J. J., & Handel, M. A. (2012). Origins of granulosa cells clarified and complexified by waves. *Biology of Reproduction*, *86*(2), 34. doi:10.1095/biolreprod.111.096651
- Flesken-Nikitin, A., Hwang, C.-I., Cheng, C.-Y., Michurina, T. V, Enikolopov, G., & Nikitin, A. Y. (2013). Ovarian surface epithelium at the junction area contains a cancer-prone stem cell niche. *Nature*, *495*(7440), 241–5. doi:10.1038/nature11979
- Fodde, R., & Brabletz, T. (2007). Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(2), 150–8. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.007
- Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P. A., Stevanović, M., ... Goodfellow, P. N. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, *372*(6506), 525–30. doi:10.1038/372525a0
- Fujimoto, Y., Tanaka, S. S., Yamaguchi, Y. L., Kobayashi, H., Kuroki, S., Tachibana, M., ... Nishinakamura, R. (2013). Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Developmental Cell*, *26*(4), 416–30. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.018
- Galas, J., Słomczyńska, M., Knapczyk-Stwora, K., Durlej, M., Starowicz, A., Tabarowski, Z., ... Szołtys, M. (2012). Steroid levels and the spatiotemporal expression of steroidogenic enzymes and androgen receptor in developing ovaries of immature rats. *Acta Histochemica*, *114*(3), 207–16. doi:10.1016/j.acthis.2011.04.006

- Gelety, T. J., & Magoffin, D. A. (1997). Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biology of Reproduction*, *56*(4), 938–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096876>
- Georg, I., Barrionuevo, F., Wiech, T., & Scherer, G. (2012). Sox9 and Sox8 are required for basal lamina integrity of testis cords and for suppression of FOXL2 during embryonic testis development in mice. *Biology of Reproduction*, *87*(4), 99. doi:10.1095/biolreprod.112.101907
- George, S. H. L., & Shaw, P. (2014). BRCA and Early Events in the Development of Serous Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, *4*, 5. doi:10.3389/fonc.2014.00005
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.-L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., ... Niehrs, C. (2011). LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Reports*, *12*(10), 1055–61. doi:10.1038/embor.2011.175
- Gore, A. V., Swift, M. R., Cha, Y. R., Lo, B., McKinney, M. C., Li, W., ... Weinstein, B. M. (2011). Rspo1/Wnt signaling promotes angiogenesis via Vegfc/Vegfr3. *Development (Cambridge, England)*, *138*(22), 4875–86. doi:10.1242/dev.068460
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., ... 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. doi:10.1038/346245a0
- Guigon, C. J., Coudouel, N., Mazaud-Guittot, S., Forest, M. G., & Magre, S. (2005). Follicular cells acquire sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology*, *146*(7), 2992–3004. doi:10.1210/en.2005-0045
- Guigon, C. J., & Magre, S. (2006). Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biology of Reproduction*, *74*(3), 450–8. doi:10.1095/biolreprod.105.047134
- Habert, R., Lejeune, H., & Saez, J. M. (2001). Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *179*(1-2), 47–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420130>
- Hinshelwood, M. M., Repa, J. J., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Mangelsdorf, D. J., & Mendelson, C. R. (2003). Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *207*(1-2), 39–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972182>
- Hirshfield, A. N. (1991). Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of Reproduction*, *44*(6), 1157–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1873389>
- Hirshfield, A. N. (1992). Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats. *Biology of Reproduction*, *47*(3), 466–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511099>
- Hohenstein, P., Slight, J., Ozdemir, D. D., Burn, S. F., Berry, R., & Hastie, N. D. (2008). High-efficiency Rosa26 knock-in vector construction for Cre-regulated overexpression and RNAi. *PathoGenetics*, *1*(1), 3. doi:10.1186/1755-8417-1-3

- Hoshii, T., Takeo, T., Nakagata, N., Takeya, M., Araki, K., & Yamamura, K. (2007). LGR4 regulates the postnatal development and integrity of male reproductive tracts in mice. *Biology of Reproduction*, *76*(2), 303–13. doi:10.1095/biolreprod.106.054619
- Houghtaling, S., Timmers, C., Noll, M., Finegold, M. J., Jones, S. N., Meyn, M. S., & Grompe, M. (2003). Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes & Development*, *17*(16), 2021–35. doi:10.1101/gad.1103403
- Houston, C. S., Opitz, J. M., Spranger, J. W., Macpherson, R. I., Reed, M. H., Gilbert, E. F., ... Schinzel, A. (1983). The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *American Journal of Medical Genetics*, *15*(1), 3–28. doi:10.1002/ajmg.1320150103
- Hsieh, M., Boerboom, D., Shimada, M., Lo, Y., Parlow, A. F., Luhmann, U. F. O., ... Richards, J. S. (2005). Mice null for Frizzled4 (Fzd4^{-/-}) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function. *Biology of Reproduction*, *73*(6), 1135–46. doi:10.1095/biolreprod.105.042739
- Huang, B., Wang, S., Ning, Y., Lamb, A. N., & Bartley, J. (1999). Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *American Journal of Medical Genetics*, *87*(4), 349–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10588843>
- Hussein, T. S., Froiland, D. A., Amato, F., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*, *118*(Pt 22), 5257–68. doi:10.1242/jcs.02644
- Jameson, S. A., Natarajan, A., Cool, J., DeFalco, T., Maatouk, D. M., Mork, L., ... Capel, B. (2012). Temporal transcriptional profiling of somatic and germ cells reveals biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse gonad. *PLoS Genetics*, *8*(3), e1002575. doi:10.1371/journal.pgen.1002575
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (n.d.). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *61*(2), 69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Jordan, B. K., Mohammed, M., Ching, S. T., Délot, E., Chen, X. N., Dewing, P., ... Vilain, E. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics*, *68*(5), 1102–9. doi:10.1086/320125
- Joshi, S., Davies, H., Sims, L. P., Levy, S. E., & Dean, J. (2007). Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor. *BMC Developmental Biology*, *7*, 67. doi:10.1186/1471-213X-7-67
- Kamata, T., Katsube, K., Michikawa, M., Yamada, M., Takada, S., & Mizusawa, H. (2004). R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1676*(1), 51–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732490>
- Karl, J., & Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, *203*(2), 323–33. doi:10.1006/dbio.1998.9068
- Kato, S., Matsubara, M., Matsuo, T., Mohri, Y., Kazama, I., Hatano, R., ... Nishimori, K. (2006). Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-4 (LGR4, Gpr48) is essential for renal development in mice. *Nephron. Experimental Nephrology*, *104*(2), e63–75. doi:10.1159/000093999

- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., & Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Developmental Cell*, 7(4), 525–34. doi:10.1016/j.devcel.2004.07.019
- Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Heroult, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H. G., & Niehrs, C. (2008). The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development (Cambridge, England)*, 135(22), 3655–64. doi:10.1242/dev.027284
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., & Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development (Cambridge, England)*, 122(9), 2813–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8787755>
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., & Matsumoto, S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 291, 21–71. doi:10.1016/B978-0-12-386035-4.00002-1
- Kim, K.-A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., ... Tomizuka, K. (2005). Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5738), 1256–9. doi:10.1126/science.1112521
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., ... Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biology*, 4(6), e187. doi:10.1371/journal.pbio.0040187
- Kim, J., Coffey, D. M., Creighton, C. J., Yu, Z., Hawkins, S. M., & Matzuk, M. M. (2012). High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3921–6. doi:10.1073/pnas.1117135109
- Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 8(5), 387–98. doi:10.1038/nrc2389
- Kocer, A., Reichmann, J., Best, D., & Adams, I. R. (2009). Germ cell sex determination in mammals. *Molecular Human Reproduction*, 15(4), 205–13. doi:10.1093/molehr/gap008
- Koo, B.-K., Spit, M., Jordens, I., Low, T. Y., Stange, D. E., van de Wetering, M., ... Clevers, H. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature*, 488(7413), 665–9. doi:10.1038/nature11308
- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348(6300), 450–2. doi:10.1038/348450a0
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351(6322), 117–21. doi:10.1038/351117a0
- Kruk, P. A., & Auersperg, N. (1992). Human ovarian surface epithelial cells are capable of physically restructuring extracellular matrix. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167(5), 1437–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1443002>

- Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*, *15*(2), 201–4. doi:10.1038/ng0297-201
- Kumar, S., Chatzi, C., Brade, T., Cunningham, T. J., Zhao, X., & Duester, G. (2011). Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nature Communications*, *2*, 151. doi:10.1038/ncomms1136
- Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2008). Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, *27*(2), 151–60. doi:10.1097/PGP.0b013e318161e4f5
- Lasala, C., Carré-Eusèbe, D., Picard, J.-Y., & Rey, R. (2004). Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-Müllerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species. *DNA and Cell Biology*, *23*(9), 572–85. doi:10.1089/1044549041939232
- Lavery, R., Chassot, A.-A., Pauper, E., Gregoire, E. P., Klopfenstein, M., de Rooij, D. G., ... Chaboissier, M.-C. (2012). Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genetics*, *8*(12), e1003170. doi:10.1371/journal.pgen.1003170
- Lei, Z. M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X., & Rao, C. V. (2001). Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *15*(1), 184–200. doi:10.1210/mend.15.1.0586
- Leushacke, M., & Barker, N. (2012). Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. *Oncogene*, *31*(25), 3009–22. doi:10.1038/onc.2011.479
- Li, J.-Y., Chai, B., Zhang, W., Fritze, D. M., Zhang, C., & Mulholland, M. W. (2014). LGR4 and its ligands, R-spondin 1 and R-spondin 3, regulate food intake in the hypothalamus of male rats. *Endocrinology*, *155*(2), 429–40. doi:10.1210/en.2013-1550
- Lindgren, P. R., Bäckström, T., Cajander, S., Damber, M.-G., Mählck, C.-G., Zhu, D., & Olofsson, J. I. (2002). The pattern of estradiol and progesterone differs in serum and tissue of benign and malignant ovarian tumors. *International Journal of Oncology*, *21*(3), 583–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12168103>
- Lowry, W. E., Blanpain, C., Nowak, J. A., Guasch, G., Lewis, L., & Fuchs, E. (2005). Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes & Development*, *19*(13), 1596–611. doi:10.1101/gad.1324905
- Lowther, W., Wiley, K., Smith, G. H., & Callahan, R. (2005). A new common integration site, Int7, for the mouse mammary tumor virus in mouse mammary tumors identifies a gene whose product has furin-like and thrombospondin-like sequences. *Journal of Virology*, *79*(15), 10093–6. doi:10.1128/JVI.79.15.10093-10096.2005
- Luo, X., Ikeda, Y., & Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, *77*(4), 481–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8187173>
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., ... Behrens, J. (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(4), 1184–93. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=134640&tool=pmcentrez&render type=abstract>

- Ma, X., Dong, Y., Matzuk, M. M., & Kumar, T. R. (2004). Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(49), 17294–9. doi:10.1073/pnas.0404743101
- Maatouk, D. M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K. L., Taketo, M. M., & Capel, B. (2008). Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Human Molecular Genetics*, *17*(19), 2949–55. doi:10.1093/hmg/ddn193
- Maatouk, D. M., Mork, L., Chassot, A.-A., Chaboissier, M.-C., & Capel, B. (2013). Disruption of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa cells in the perinatal Wnt4 mutant ovary. *Developmental Biology*, *383*(2), 295–306. doi:10.1016/j.ydbio.2013.08.026
- Magoffin, D. A. (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *37*(7), 1344–9. doi:10.1016/j.biocel.2005.01.016
- Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Méjean, C., ... Boizet-Bonhoure, B. (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *The EMBO Journal*, *24*(10), 1798–809. doi:10.1038/sj.emboj.7600660
- Mandai, M., Konishi, I., Kuroda, H., & Fujii, S. (2007). LH/hCG action and development of ovarian cancer--a short review on biological and clinical/epidemiological aspects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *269*(1-2), 61–4. doi:10.1016/j.mce.2006.11.014
- Matson, C. K., Murphy, M. W., Sarver, A. L., Griswold, M. D., Bardwell, V. J., & Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, *476*(7358), 101–4. doi:10.1038/nature10239
- Matzuk, M. M. (2001). Eggs in the balance. *Nature Genetics*, *28*(4), 300–1. doi:10.1038/91039
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, *21*(2), 200–14. doi:10.1210/edrv.21.2.0394
- Mok, S. C., Kwong, J., Welch, W. R., Samimi, G., Ozbun, L., Bonome, T., ... Wong, K.-K. (2007). Etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Disease Markers*, *23*(5-6), 367–76. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3851194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., ... Poulat, F. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development (Cambridge, England)*, *136*(11), 1813–21. doi:10.1242/dev.032631
- Monkley, S. J., Delaney, S. J., Pennisi, D. J., Christiansen, J. H., & Wainwright, B. J. (1996). Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development (Cambridge, England)*, *122*(11), 3343–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8951051>
- 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. *Nature Genetics*, 14(1), 62–8. doi:10.1038/ng0996-62

- Morita, H., Mazerbourg, S., Bouley, D. M., Luo, C.-W., Kawamura, K., Kuwabara, Y., ... Hsueh, A. J. W. (2004). Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. *Molecular and Cellular Biology*, 24(22), 9736–43. doi:10.1128/MCB.24.22.9736-9743.2004
- Mork, L., Maatouk, D. M., McMahon, J. A., Guo, J. J., Zhang, P., McMahon, A. P., & Capel, B. (2012). Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biology of Reproduction*, 86(2), 37. doi:10.1095/biolreprod.111.095208
- Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., ... Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature Biotechnology*, 22(4), 411–7. doi:10.1038/nbt950
- Motamedi, F. J., Badro, D. A., Clarkson, M., Rita Lecca, M., Bradford, S. T., Buske, F. A., ... Schedl, A. (2014). WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors. *Nature Communications*, 5, 4444. doi:10.1038/ncomms5444
- Mullany, L. K., & Richards, J. S. (2012). Minireview: animal models and mechanisms of ovarian cancer development. *Endocrinology*, 153(4), 1585–92. doi:10.1210/en.2011-2121
- Munger, S. C., Aylor, D. L., Syed, H. A., Magwene, P. M., Threadgill, D. W., & Capel, B. (2009). Elucidation of the transcription network governing mammalian sex determination by exploiting strain-specific susceptibility to sex reversal. *Genes & Development*, 23(21), 2521–36. doi:10.1101/gad.1835809
- Murdoch, W. J., & Martinchick, J. F. (2004). Oxidative damage to DNA of ovarian surface epithelial cells affected by ovulation: carcinogenic implication and chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 229(6), 546–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15169974>
- Nachtigal, M. W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D. L., Flanagan, J. N., Hammer, G. D., & Ingraham, H. A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*, 93(3), 445–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590178>
- Nam, J.-S., Park, E., Turcotte, T. J., Palencia, S., Zhan, X., Lee, J., ... Yoon, J. K. (2007). Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Developmental Biology*, 311(1), 124–35. doi:10.1016/j.ydbio.2007.08.023
- Nam, J.-S., Turcotte, T. J., & Yoon, J. K. (2007). Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expression Patterns: GEP*, 7(3), 306–12. doi:10.1016/j.modgep.2006.08.006
- Neufeld, S., Rosin, J. M., Ambasta, A., Hui, K., Shaneman, V., Crowder, R., ... Cobb, J. (2012). A conditional allele of Rspo3 reveals redundant function of R-spondins during mouse limb development. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 50(10), 741–9. doi:10.1002/dvg.22040
- Nilsson, E., Rogers, N., & Skinner, M. K. (2007). Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction (Cambridge, England)*, 134(2), 209–21. doi:10.1530/REP-07-0119

- Notarnicola, C., Malki, S., Berta, P., Poulat, F., & Boizet-Bonhoure, B. (2006). Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene Expression Patterns: GEP*, 6(7), 695–702. doi:10.1016/j.modgep.2006.01.001
- O'Bryan, M. K., Takada, S., Kennedy, C. L., Scott, G., Harada, S., Ray, M. K., ... Mishina, Y. (2008). Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Developmental Biology*, 316(2), 359–70. doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.042
- Ohkawara, B., Glinka, A., & Niehrs, C. (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Developmental Cell*, 20(3), 303–14. doi:10.1016/j.devcel.2011.01.006
- Ono, M., & Harley, V. R. (2013). Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(2), 79–91. doi:10.1038/nrendo.2012.235
- Ootani, A., Li, X., Sangiorgi, E., Ho, Q. T., Ueno, H., Toda, S., ... Kuo, C. J. (2009). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nature Medicine*, 15(6), 701–6. doi:10.1038/nm.1951
- Osterholzer, H. O., Johnson, J. H., & Nicosia, S. V. (1985). An autoradiographic study of rabbit ovarian surface epithelium before and after ovulation. *Biology of Reproduction*, 33(3), 729–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4052531>
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M. C., Dellambra, E., Valentini, S., ... Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature Genetics*, 38(11), 1304–9. doi:10.1038/ng1907
- Parr, B. A., & McMahon, A. P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*, 395(6703), 707–10. doi:10.1038/27221
- Pectasides, D., Pectasides, E., & Kassanos, D. (2008). Germ cell tumors of the ovary. *Cancer Treatment Reviews*, 34(5), 427–41. doi:10.1016/j.ctrv.2008.02.002
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology*, 234(2), 339–51. doi:10.1006/dbio.2001.0269
- Perez, G. I., Robles, R., Knudson, C. M., Flaws, J. A., Korsmeyer, S. J., & Tilly, J. L. (1999). Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Genetics*, 21(2), 200–3. doi:10.1038/5985
- Piccin, D., & Morshead, C. M. (2011). Wnt signaling regulates symmetry of division of neural stem cells in the adult brain and in response to injury. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 29(3), 528–38. doi:10.1002/stem.589
- Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D. E., Préhu, M. O., Puliti, A., ... Goossens, M. (1998). SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nature Genetics*, 18(2), 171–3. doi:10.1038/ng0298-171
- Pitetti, J.-L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M. D., Aubry, F., ... Nef, S. (2013). An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(5), 814–27. doi:10.1210/me.2012-1258

- Polanco, J. C., Wilhelm, D., Davidson, T.-L., Knight, D., & Koopman, P. (2010). Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Human Molecular Genetics*, *19*(3), 506–16. doi:10.1093/hmg/ddp520
- Popova, E., Krivokharchenko, A., Ganten, D., & Bader, M. (2002). Comparison between PMSG- and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats. *Molecular Reproduction and Development*, *63*(2), 177–82. doi:10.1002/mrd.10173
- Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Shan, J., Railo, A., Heinonen, K. M., Miinalainen, I., Yan, W., ... Vainio, S. J. (2014). Wnt4, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimüllerian hormone expression during oocyte maturation in the female follicle. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *28*(4), 1568–81. doi:10.1096/fj.13-233247
- Przybycin, C. G., Kurman, R. J., Ronnett, B. M., Shih, I.-M., & Vang, R. (2010). Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? *The American Journal of Surgical Pathology*, *34*(10), 1407–16. doi:10.1097/PAS.0b013e3181ef7b16
- Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N., & Matzuk, M. M. (2004). NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5687), 1157–9. doi:10.1126/science.1099755
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, *434*(7035), 843–50. doi:10.1038/nature03319
- Ricciardelli, C., & Oehler, M. K. (2009). Diverse molecular pathways in ovarian cancer and their clinical significance. *Maturitas*, *62*(3), 270–5. doi:10.1016/j.maturitas.2009.01.001
- Richards, J. S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, *15*(6), 725–51. doi:10.1210/edrv-15-6-725
- Ricken, A., Lochhead, P., Kontogianna, M., & Farookhi, R. (2002). Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology*, *143*(7), 2741–9. doi:10.1210/endo.143.7.8908
- Rodgers, R. J., Irving-Rodgers, H. F., & Russell, D. L. (2003). Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction (Cambridge, England)*, *126*(4), 415–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525524>
- Rucker, E. B., Dierisseau, P., Wagner, K. U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Flaws, J. A., & Hennighausen, L. (2000). Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *14*(7), 1038–52. doi:10.1210/mend.14.7.0465
- Saegusa, M., & Okayasu, I. (2001). Frequent nuclear beta-catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation. *The Journal of Pathology*, *194*(1), 59–67. doi:10.1002/path.856
- Salmon, N. A., Handyside, A. H., & Joyce, I. M. (2005). Expression of Sox8, Sfl, Gata4, Wt1, Dax1, and Fog2 in the mouse ovarian follicle: implications for the regulation of Amh expression. *Molecular Reproduction and Development*, *70*(3), 271–7. doi:10.1002/mrd.20208
- Santin, A. D., Bellone, S., Van Stedum, S., Bushen, W., Palmieri, M., Siegel, E. R., ... Pecorelli, S. (2005). Amplification of c-erbB2 oncogene: a major prognostic indicator in uterine serous papillary carcinoma. *Cancer*, *104*(7), 1391–7. doi:10.1002/cncr.21308

- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, *459*(7244), 262–5. doi:10.1038/nature07935
- Schildkraut, J. M., Schwingl, P. J., Bastos, E., Evanoff, A., & Hughes, C. (1996). Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology*, *88*(4 Pt 1), 554–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8841217>
- Schleinitz, D., Böttcher, Y., Blüher, M., & Kovacs, P. (2014). The genetics of fat distribution. *Diabetologia*, *57*(7), 1276–86. doi:10.1007/s00125-014-3214-z
- Schmahl, J., Eicher, E. M., Washburn, L. L., & Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development (Cambridge, England)*, *127*(1), 65–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10654601>
- Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.-C., & Treier, M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development (Cambridge, England)*, *131*(4), 933–42. doi:10.1242/dev.00969
- Seeherunvong, T., Perera, E. M., Bao, Y., Benke, P. J., Benigno, A., Donahue, R. P., & Berkovitz, G. D. (2004). 46,XX sex reversal with partial duplication of chromosome arm 22q. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *127A*(2), 149–51. doi:10.1002/ajmg.a.20630
- Seitz, C. S., van Steensel, M., Frank, J., Senderek, J., Zerres, K., Hamm, H., & Bergmann, C. (2007). The Wnt signalling ligand RSPO4, causing inherited onychia, is not mutated in a patient with congenital nail hypoplasia/aplasia with underlying skeletal defects. *The British Journal of Dermatology*, *157*(4), 801–2. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08059.x
- Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, *453*(7197), 930–4. doi:10.1038/nature06944
- Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2013). Genetic control of testis development. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, *7*(1-3), 21–32. doi:10.1159/000342221
- Seshagiri, S., Stawiski, E. W., Durinck, S., Modrusan, Z., Storm, E. E., Conboy, C. B., ... de Sauvage, F. J. (2012). Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature*, *488*(7413), 660–4. doi:10.1038/nature11282
- Simons, M., & Mlodzik, M. (2008). Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annual Review of Genetics*, *42*, 517–40. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091432
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ... Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, *346*(6281), 240–4. doi:10.1038/346240a0
- Singh, A. P., Cummings, C. A., Mishina, Y., & Archer, T. K. (2013). SOX8 regulates permeability of the blood-testes barrier that affects adult male fertility in the mouse. *Biology of Reproduction*, *88*(5), 133. doi:10.1095/biolreprod.112.107284

- Smith, H. O., Berwick, M., Verschraegen, C. F., Wiggins, C., Lansing, L., Muller, C. Y., & Qualls, C. R. (2006). Incidence and survival rates for female malignant germ cell tumors. *Obstetrics and Gynecology*, *107*(5), 1075–85. doi:10.1097/01.AOG.0000216004.22588.ce
- Smith, C. A., Shoemaker, C. M., Roeszler, K. N., Queen, J., Crews, D., & Sinclair, A. H. (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Developmental Biology*, *8*, 72. doi:10.1186/1471-213X-8-72
- Smith, G. W., & Meidan, R. (2014). Ever-changing cell interactions during the life span of the corpus luteum: Relevance to luteal regression. *Reproductive Biology*, *14*(2), 75–82. doi:10.1016/j.repbio.2013.12.004
- Sock, E., Schmidt, K., Hermanns-Borgmeyer, I., Bösl, M. R., & Wegner, M. (2001). Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(20), 6951–9. doi:10.1128/MCB.21.20.6951-6959.2001
- Southard-Smith, E. M., Kos, L., & Pavan, W. J. (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nature Genetics*, *18*(1), 60–4. doi:10.1038/ng0198-60
- Soyal, S. M., Amleh, A., & Dean, J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development (Cambridge, England)*, *127*(21), 4645–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023867>
- Stevens, L. C., & Varnum, D. S. (1974). The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. *Developmental Biology*, *37*(2), 369–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4826282>
- Svingen, T., & Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes & Development*, *27*(22), 2409–26. doi:10.1101/gad.228080.113
- Swain, A., & Lovell-Badge, R. (1999). Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & Development*, *13*(7), 755–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10197976>
- Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.-L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., ... De Robertis, E. M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, *143*(7), 1136–48. doi:10.1016/j.cell.2010.11.034
- Tevosian, S. G., Albrecht, K. H., Crispino, J. D., Fujiwara, Y., Eicher, E. M., & Orkin, S. H. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development (Cambridge, England)*, *129*(19), 4627–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223418>
- Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., ... Kakitani, M. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Human Molecular Genetics*, *17*(9), 1278–91. doi:10.1093/hmg/ddn036
- Tortolero-Luna, G., & Mitchell, M. F. (1995). The epidemiology of ovarian cancer. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, *23*, 200–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8747397>

- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., ... Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, *13*(11), 1171–81. doi:10.1093/hmg/ddh124
- Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., ... Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, *139*(6), 1130–42. doi:10.1016/j.cell.2009.11.021
- Ungewitter, E. K., & Yao, H. H.-C. (2013). How to make a gonad: cellular mechanisms governing formation of the testes and ovaries. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, *7*(1-3), 7–20. doi:10.1159/000338612
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, *397*(6718), 405–9. doi:10.1038/17068
- Van Genderen, C., Okamura, R. M., Fariñas, I., Quo, R. G., Parslow, T. G., Bruhn, L., & Grosschedl, R. (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & Development*, *8*(22), 2691–703. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7958926>
- Van Schoore, G., Mendive, F., Pochet, R., & Vassart, G. (2005). Expression pattern of the orphan receptor LGR4/GPR48 gene in the mouse. *Histochemistry and Cell Biology*, *124*(1), 35–50. doi:10.1007/s00418-005-0002-3
- Vidal, V. P., Chaboissier, M. C., de Rooij, D. G., & Schedl, A. (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics*, *28*(3), 216–7. doi:10.1038/90046
- Viger, R. S., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development (Cambridge, England)*, *125*(14), 2665–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636081>
- Vigier, B., Picard, J. Y., Tran, D., Legeai, L., & Josso, N. (1984). Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*, *114*(4), 1315–20. doi:10.1210/endo-114-4-1315
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., ... Scherer, G. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, *79*(6), 1111–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001137>
- Wang, D., Huang, B., Zhang, S., Yu, X., Wu, W., & Wang, X. (2013). Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. *Genes & Development*, *27*(12), 1339–44. doi:10.1101/gad.219360.113
- Wasif, N., & Ahmad, W. (n.d.). A novel nonsense mutation in RSPO4 gene underlies autosomal recessive congenital anonychia in a Pakistani family. *Pediatric Dermatology*, *30*(1), 139–41. doi:10.1111/j.1525-1470.2011.01587.x
- Wei, Q., Yokota, C., Semenov, M. V., Doble, B., Woodgett, J., & He, X. (2007). R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(21), 15903–11. doi:10.1074/jbc.M701927200

- Whyte, J. L., Smith, A. A., & Helms, J. A. (2012). Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(8), a008078. doi:10.1101/cshperspect.a008078
- Willert, K., & Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a007864. doi:10.1101/cshperspect.a007864
- Wright, E. M., Snopce, B., & Koopman, P. (1993). Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Research*, 21(3), 744. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=309180&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Wu, R., Zhai, Y., Fearon, E. R., & Cho, K. R. (2001). Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Research*, 61(22), 8247–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719457>
- Wu, R., Hendrix-Lucas, N., Kuick, R., Zhai, Y., Schwartz, D. R., Akyol, A., ... Cho, K. R. (2007). Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell*, 11(4), 321–33. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.016
- Yamada, W., Nagao, K., Horikoshi, K., Fujikura, A., Ikeda, E., Inagaki, Y., ... Takubo, K. (2009). Craniofacial malformation in R-spondin2 knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(3), 453–8. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.066
- Young, J. M., & McNeilly, A. S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(4), 489–504. doi:10.1530/REP-10-0094
- Zhang, F. P., Poutanen, M., Wilbertz, J., & Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15(1), 172–83. doi:10.1210/mend.15.1.0582
- Zheng, W., Zhang, H., Gorre, N., Risal, S., Shen, Y., & Liu, K. (2014). Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Human Molecular Genetics*, 23(4), 920–8. doi:10.1093/hmg/ddt486

Résumé

Mon laboratoire d'accueil a participé à l'identification du gène *R-spondin1* (*Rspo1*), dont les mutations sont responsables d'anomalies cutanées telles que l'hyperkératose palmo-plantaire, les prédispositions aux cancers spinocellulaires et certains types d'inversions de sexe. La génération du modèle murin a permis de montrer que RSP01, un activateur de la voie de signalisation *Wnt/βcatenin*, est nécessaire à la différenciation ovarienne.

R-spondin1 et *Sox9* sont connus comme étant des facteurs clé de la détermination du sexe femelle et mâle respectivement. Dans la première partie de ma thèse, j'ai participé à l'étude de leur fonction dans les pathologies d'inversions de sexe afin de déterminer le rôle de chacune de ces voies dans ces processus. La compréhension de ces processus au stade embryonnaire est indispensable pour pouvoir ensuite comprendre les différentes pathologies des gonades et leurs mécanismes d'apparition. Ces études ont confirmé tout d'abord les résultats déjà obtenus sur le rôle de *Sox9* dans la différenciation testiculaire, en apportant également un modèle d'inactivation du gène *Sox9* viable,

contrairement aux modèles utilisés jusqu'à présent. Grâce à ce modèle nous avons pu générer également un modèle murin de double invalidation de *Rspo1* and *Sox9* afin d'évaluer l'importance de chacune de ces voies dans la détermination du sexe. Notre étude a démontré que la différenciation testiculaire peut avoir lieu en l'absence de *Sry* et *Sox9*. Ils montrent également que *R-spondin1* est nécessaire au développement ovarien. L'ensemble de ces observations nous ont permis de proposer un nouveau modèle pour la détermination du sexe chez la souris qui ne considère plus la voie de différenciation ovarienne comme une voie par défaut, mais plutôt comme une voie qui doit être activement induite par *R-spondin1*. Ainsi, la détermination du sexe peut être considérée comme une balance entre la voie de signalisation mâle activée par les *Sox* et la voie de signalisation femelle activée par *R-spondin1*.

Je me suis ensuite penchée dans la deuxième partie de ma thèse, sur le rôle de *R-spondin1* dans la physiologie de l'ovaire post natal. Sachant que *Rspo1* est un facteur de maintien de l'état non différencié des cellules de la granulosa et que son expression diminue de façon significative après la naissance, nous avons étudié l'impact que pouvait avoir le maintien de son expression tout au long de la vie adulte. Pour cela nous avons étudié un modèle murin de gain-de-fonction de *R-spondin1* dans l'ovaire. Les ovaires de ces souris présentent un grand nombre de structures folliculaires anormales. Les cellules qui constituent ces structures expriment FOXL2 et sont donc des cellules de la granulosa. Cependant, ces cellules expriment également des marqueurs épithéliaux de leurs cellules progénitrices qui sont localisées dans l'épithélium de surface ovarien. Cela suggère que le maintien de l'expression de *R-spondin1* empêche ces cellules de se différencier en cellules de la granulosa mature. De ce fait, l'expression de *R-spondin1* doit être transitoire afin de permettre la différenciation normale des cellules de la granulosa. De plus, l'expression de *R-spondin1* semble empêcher l'atrésie folliculaire qui est un processus normal de l'ovaire visant à éliminer une grande partie des follicules anormaux, dont certains qui ne seront pas amenés à ovuler. Nous avons également observé un nombre accru de kystes sanguins après induction de l'ovulation dans les ovaires des souris gain-de-fonction de *R-spondin1*. Cela montre que l'expression de *R-spondin1* favorise l'apparition de kystes après ovulation.

En conclusion, notre étude montre que la détermination du sexe ainsi que l'homéostasie de l'ovaire adulte doivent être finement régulées durant tous les stades de la vie de l'individu puisque des dérégulations de ses gènes clefs, comme le gène *R-spondin1* mènent à l'apparition de diverses pathologies, telles que les inversions de sexe et plusieurs pathologies de l'ovaire adulte telles que les tumeurs ovariennes.