Développement de la lignée germinale femelle humaine

Marine Poulain

▶ **To cite this version:**

Marine Poulain. Développement de la lignée germinale femelle humaine. Biologie de la reproduction. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. ⟨NNT : 2014PA11T056⟩. ⟨tel-01186038⟩

HAL Id: tel-01186038

https://theses.hal.science/tel-01186038v1

Submitted on 24 Aug 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.

HAL Authorization

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :
BIOSIGNE

Laboratoire : *Laboratoire de Développement des Gonades*
UMR967/INSERM/Université Paris 7/Université Paris Sud

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

Marine POULAIN

Développement de la lignée germinale femelle humaine

Date de soutenance : 23/11/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Nelly ACHOUR-FRYDMAN	PU-PH, Paris Sud
Co-directeur de thèse :	Gabriel LIVERA	PU-DR, Paris 7
Rapporteurs :	Rachel LEVY	PU-PH, Paris 13
	Dominique ROYERE	PU-PH, Université de Tours
Examinateurs :	Philippe MONGET	DR, Université de Tours
	Daniel VAIMAN	DR, Paris 5

A mes parents

A ma famille

Et à tous ceux auxquels je tiens

« *De même que l'être humain est le plus parfait des animaux, au sein de l'espèce humaine, l'homme est plus parfait que la femme […]. La femme est moins parfaite que l'homme en ses organes de reproduction. Car ceux-ci se forment alors qu'elle est encore fœtus, et leur formation ne peut se poursuivre par manque de la chaleur nécessaire à leur émergence et projection vers l'extérieur.* » Galien, Procédés anatomiques, vers l'an 177.

Pendant plus de 2000 ans, la voie de différenciation ovarienne a été considérée comme une voie par défaut, faute de pouvoir se différencier en testicule. Malgré un premier passage devant Galien, ces dernières années passées au Laboratoire de Développement des gonades m'ont confirmé le contraire et j'espère que ce manuscrit saura convaincre le lecteur. To be continued…

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement l'ensemble des membres composant le jury de cette thèse d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement le Docteur Philippe Monget de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

J'adresse également tous mes remerciements au Professeur Rachel Levy et au Professeur Dominique Royère d'avoir accepté d'assumer la lourde tâche d'être rapporteurs de ces travaux.

Je tiens à remercier sincèrement le Docteur Daniel Vaiman d'avoir accepté de juger cette thèse en tant qu'examinateur.

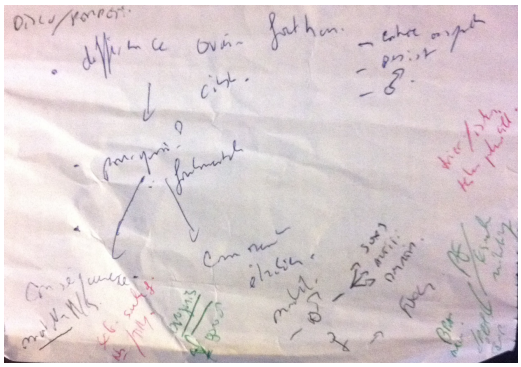
Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Nelly Achour-Frydman et le Professeur Gabriel Livera sans lesquels ce travail n'aurait jamais pu voir le jour. Merci à tous les deux de m'avoir fait confiance et d'avoir accepté de diriger cette thèse, de m'avoir ouvert les portes de la recherche et de m'avoir tant appris et apporté au cours de ces dernières années.

Des mots ne suffiront pas pour remercier toutes les personnes ayant contribué à cette histoire, (de près ou de plus loin, professionnellement ou personnellement) à la hauteur de la reconnaissance que je leur dois. Donc tout simplement MERCI à tous, j'espère ne pas vous décevoir et vous redonner en retour autant que ce que je reçois quotidiennement.

Cependant, je tiens à remercier particulièrement toute l'équipe du LDG sans laquelle ces travaux n'auraient jamais vu le jour. Merci à tous d'avoir pris le temps de m'apprendre la « vraie Sciences » avec ses hauts (quand ça marche bien) et ses bas (quand ça ne marche plus du tout du tout), m'avoir permis de réussir les expériences ou comprendre pourquoi ça n'avait pas marché, bref, m'avoir fait découvrir une autre façon de réfléchir et avoir supporté de me voir en pointillés. Et puis la Sciences n'avance pas sans bonne humeur, donc un grand merci à tous pour ces fous rires (la photo mania de certain(e)s notamment) et ces heureux moments.

Je remercie sincèrement le professeur René Habert de m'avoir accueillie initialement au sein du Laboratoire pour mon stage de M2 et m'avoir ainsi offert la chance de découvrir la recherche fondamentale et l'équipe du LDRG.

Un énorme merci à Gabriel pour m'avoir accordé ta confiance et pris le pari de m'encadrer au cours de ces 5 années de M2 et thèse malgré ma formation initiale médicale et mes obligations hospitalières et universitaires (ce n'était pourtant pas gagné !). Merci pour ta rigueur scientifique, tes connaissances sans limites (j'espère pouvoir maîtriser un jour 1/10ème de ton savoir), tes idées géniales (agaçant même) et tes gentils encouragements dans les moments un peu plus durs de fin de thèse. J'espère pouvoir continuer à travailler avec toi sur de beaux projets, maintenant que j'arrive à déchiffrer tous tes petits mots…



Merci à Virginie pour tes connaissances, ta gentillesse et tes conseils avisés, ta disponibilité malgré tes nombreuses obligations ; Clotilde, pour ton aide précieuse dans ces travaux et toutes tes anecdotes (inépuisable !) ; Sébastien, le roi du faxcalibur et de la pièce histo (alors, bouin ou formol ?), toujours prêt pour une boutade ; Sophie, pour m'avoir appris les rudiments de la PCR et la maîtrise de la bête (le 7900), Delphine, pour tous les prélèvements que tu as réalisés pour moi et les greffes sauvées lors de mes absences ; Justine, pour ton aide, ta bonne humeur et le virus Ebola que tu as bien failli nous ramener du Burkina (ne plus toucher au bêtes volantes à poil désormais attention tu feras) ; Aurélie G, the best secrétaire, qui a assumé, toujours avec le sourire, mes nombreux renouvellements de contrat avec toutes les lourdeurs administratives qui vont avec (et bien plus encore, mea culpa), Emmanuelle, pour ta grande valeur scientifique et ta philosophie de la vie (always look on the bright side of life), Aurélie, que je retrouve après notre lointain M2, et Stéphanie qui nous quitte (snif, Eric, voleur !!). Merci aussi à mes co-thésards actuels, Emilie, keep cool, ton énorme travail va aboutir à une thèse magnifique ; Soria, pour tous les petits ovaires que tu m'as trouvé et tes

fous rires ; Jonathan, le petit dernier mais pas le moins motivé ! Et surtout mes anciens co-thésards qui m'ont abandonné, je nomme Thierry, exilé à NYC (trop dur…), Vincent, qui m'a chauffé la place dans le bureau et Benoit avec qui j'ai partagé ce même bureau, pour le meilleur et pour le meilleur. Je vous souhaite le bonheur que vous méritez , mais on en discute bientôt autour d'un verre ;)

Merci aux autres anciens : Ronan (Ps les mecs, on m'a vendu la mèche : c'est pas très sportif vos soirées natation ☺), Jacqueline, Jb, et aux chercheurs du LGAG, en particulier Vilma, pierre, Isabelle et Bruno pour les bons moments partagés et vos conseils. Merci a Luis et Sylvie pour leur gestion dynamique des labos et à toute l'équipe de l'animalerie du CEA (mention spéciale à Vero) qui prend soin de nos petites souris toute l'année.

Egalement un remerciement tout particulier au Professeur Alexandra Benachi et toute l'équipe de Gynécologie-obstétrique de l'hôpital Antoine Béclère (en particulier Stéphanie Pozzi) qui a accepté de collaborer avec nous et nous a permis de réaliser ces travaux de thèse. Merci également aux patientes qui ont accepté de donner leurs prélèvements pour la recherche et qui ont contribué à poser une (toute) petite pierre supplémentaire à l'histoire de nos travaux scientifiques.

Je tiens aussi à remercier infiniment toute l'équipe de PMA de Jean Dalsace. Ces cinq années, chouchoutée par la « famille » béclèrienne ont été un pur bonheur. Je resterai fier à jamais d'avoir été accueillie et formée dans un des (le) Temple(s) de la FIV où l'on m'a appris rigueur, innovation et performance pour offrir le meilleur aux patientes, dans une ambiance de travail exceptionnelle (voire même fusionnelle). Merci de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ces travaux de thèse sans jamais vous plaindre de mes absences. La gestion d'un double (triple) emploi du temps n'est pas toujours aisé et je vous remercie de m'avoir soutenue dans ce quotidien schizophrénique.

Je remercie particulièrement « maman Nelly » pour m'avoir autant appris, m'avoir protégée et accompagnée tout au long du chemin en clinique et en recherche. Tu connais déjà l'estime et la reconnaissance que j'ai pour toi, je te serai éternellement reconnaissante pour tout ce que tu m'as donné. J'espère que tu me pardonneras d'avoir choisi de m'émanciper professionnellement et de quitter le doux foyer de Clamart et que le temps cicatrisera nos peines mutuelles. J'espère arriver, un jour, à gérer une équipe aussi formidablement que toi.

Un grand merci aussi à la douce Laeti. Ton humeur et ta joie de vivre sont à l'égal de tes compétences, immenses, et travailler à tes côtés à été un bonheur quotidien (et me manquera beaucoup). J'espère arriver un jour à être une superwoman comme toi (sauf que je n'aurai jamais tes jolies yeux bleus…). Je te souhaite énormément de bonheur avec ta famille nouvellement agrandie.

Merci à mes collègues biologistes. Anne, pour ta bonne humeur, ton aide et ton côté « pro/efficacité ». Tu as assuré et tu vas continuer à assurer. Je suis heureuse d'avoir travaillé à tes côtés et que ce soit toi qui reprennes mon bureau. Merci aussi à Claire, Ilan et Stéphane pour tous les bons moments partagés ensembles, Meriem qui a rejoins son Maroc natal pour d'autres aventures et Alexandra qui m'a passé le relais.

A toutes les filles du labo, qui m'ont entouré et autant appris. C'est toujours impressionnant d'arriver dans l'antre du labo de Clamart mais une fois qu'on y est happé, il est difficile d'en

sortir. Vous allez beaucoup me manquer, vos fous rires, votre gentillesse. la gestion impeccable des rush et votre professionnalisme. Les babas au rhum aussi blan ;). Merci merci à Blan, Virginie, Cécé, Sophie, Cricri, Cathie et Sandrine qui nous a quitté. Et merci à notre homme de la situation, Benoit, qui survit au milieu de toutes ces filles et nous gâte (un peu trop) en mets culinaires sucrés. Merci à Mylène pour tous les dossiers, courriers, papiers, que je t'ai demandé de ressortir, ranger, trier. Et une pensée toute particulière à Fanfan pour ton extrême gentillesse (j'espère que Christine et marine vont continuer de pondre beaucoup de bons œufs frais pendant longtemps).

Merci aussi à tous mes collègues gynécos pour m'avoir appris les rudiments de la stim et apporté une vision clinique de la PMA. L'hégémonie clinico-biologique de Clamart est certainement un des secrets de la réussite. Grâce à vous, j'ai pu passer de nombreuses heures à traquer les dossiers non informatisés ;). Merci à Renato pour sa grande compétence, travailler avec des référents du domaine comme toi m'a beaucoup apporté. A Vanessa (Madame bilan d'implantation, tiens bon !), Sarah (see you soon), Valérie, Elodie, Claudia et Estelle, sans oublier Fred et ses poissons, Michael et ses baskets, Soizic et sa perfection. Sans oublier non plus l'équipe des infs, les secrétaires, les sages-femmes les aides-soignantes et Rachel.

Un grand merci aussi à l'équipe d'enseignants de Paris Sud pour m'avoir fait passer de l'autre côté des salles de TP/TD. Merci au Professeur Gerard Tachdjian pour m'avoir accordé sa confiance pour cette tâche, à Anne-marie et Sophie pour leur coaching, Lucie, Rima, Abdel, Cindy, Géraldine, Narjes et tous les autres. J'ai adoré enseigner à vos côtés et j'espère que cette expérience se reproduira de nouveau. Aller chercher le retro à un étage, la rallonge à un autre et les fiches étudiants encore ailleurs avant le début du cours me manque déjà ! Merci aussi aux étudiants qui ont accepté d'apprendre avec moi.

Bien sûr, un grand merci à l'équipe de Neuilly-Foch qui a accepté de m'accueillir prochainement. Merci tout particulièrement au Professeur René Frydman et au Professeur Jean-marc Ayoubi qui me font le grand honneur de m'accorder leur confiance. Prête pour de nouvelles aventures à vos côtés et ceux de Françoise, Pauline, Sarah, Pierre, Stéphanie, Claire et le reste de l'équipe !

Et enfin, un grand merci, certainement le plus grand, à mes parents, mes sœurs, mon frère et toute ma famille. Vous êtes ma vraie force et je vous aime. Sans vous, rien de tout cela ne serait arrivé. J'espère que vous serez fiers de ce travail.

Et à tous mes amis qui remplissent mon quotidien de joie et de bonheur. Mais il n'y a pas besoin de thèse pour vous dire tout cela. A très très vite.

AVANT-PROPOS

La lignée germinale constitue le lien cellulaire entre les générations d'une même espèce. Les cellules germinales se développent dans des organes spécifiques : les gonades (ovaires et testicules). Ces organes se forment dès les premières semaines de vie fœtale et très tôt les précurseurs de la lignée germinale les colonisent. Les gonades ne produiront des gamètes fonctionnels (ovocytes et spermatozoïdes) qu'à l'âge adulte. Le processus de mise en place de la lignée germinale au sein des gonades est fondamental puisqu'il conditionne en grande partie la fertilité à l'âge adulte. C'est également un processus très long et complexe qui peut être la cible de perturbations à divers moments de la vie de l'individu. Les mécanismes fondamentaux de ce développement ont été étudiés chez plusieurs organismes modèles. Chez les mammifères la vaste majorité des connaissances sont issues du modèle murin. Chez l'Homme, le développement des gonades est relativement bien décrit histologiquement ainsi que la fonction endocrine à l'âge adulte. Mais quels sont les signaux imposant aux cellules germinales (CG) de se multiplier puis se différencier en période fœtale ? Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de l'engagement des CG dans une voie de différenciation sexuelle ? Ces questions persistent en partie du fait que le matériel d'étude humain reste difficile d'accès pendant la vie fœtale et les mécanismes restent très souvent extrapolés des études réalisées chez la souris. Pourtant, même si les modèles présentent des similitudes, ils divergent aussi par des différences majeures qui posent la question de la pertinence de la transposition des mécanismes décrits chez la souris à l'Homme. La fonction de Reproduction chez l'Homme est menacée et les données épidémiologiques pointent du doigt une baisse inquiétante de la fertilité chez l'Homme au cours des dernières décennies. La prise en charge croissante des couples en assistance médicale à la procréation (AMP) en est, dans une certaine mesure, le reflet. En France, plus de 140 000 tentatives d'AMP ont été réalisées en 2011 et ont permis la naissance de plus de 20 000 enfants, soit 1 naissance sur 36 (données de l'Agence de la Biomédecine). Ces données appuient l'importance de comprendre les mécanismes en jeu chez l'humain pour pouvoir prévenir des troubles de la fertilité et d'améliorer les stratégies de préservation ou de restauration de la fertilité.

Au commencement de ce projet, le développement des gonades fœtales était largement décrit chez la souris, mais principalement chez le mâle. Les rares données chez l'Homme étaient principalement histologiques. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la détermination du sexe et l'orientation sexuelle des CG commençaient à être compris chez la souris, aucune donnée mécanistique chez l'Homme n'était disponible. Le projet s'est par ailleurs inscrit dans un contexte favorable, profitant des avancées en matière de recherche sur les perturbateurs

endocriniens (PE), au sein d'un laboratoire particulièrement impliqué dans l'analyse de la perturbation du développement des CG et des fonctions de reproduction par les polluants environnementaux. Les données disponibles étaient principalement issues d'études chez le rat et chez le mâle. Seule une publication, réalisée dans le laboratoire, relatait les effets de polluants environnementaux sur le testicule fœtal humain {Lambrot et al., 2006, #6525} et aucune donnée n'était disponible sur les effets des PE et polluants sur le développement ovarien.

Le développement des gonades fœtales humaines, en particulier l'ovaire, est sous étudié en dépit de son importance. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier cette période du développement ovarien et de nous focaliser plus particulièrement sur la période d'entrée en méiose des cellules germinales dans l'ovaire. Grâce à une collaboration avec le service de Gynécologie-Obstétrique de l'hôpital Antoine Béclère, nous disposons de matériel d'étude fœtal humain et les travaux de cette thèse ont pu être réalisés chez l'Homme en comparaison avec les mécanismes murins déjà décrits. Le modèle de culture organotypique d'ovaires fœtaux humains était déjà en place au laboratoire mais nous limitait dans les études fonctionnelles. C'est pourquoi nous avons développé au cours de cette thèse un modèle de xénogreffe d'ovaires fœtaux humains chez la souris immunodéficiente nous permettant de cibler une période précise de la différenciation germinale et d'utiliser des stratégies d'ARN interférence sur du matériel humain. Au cours de nos observations histologiques nous avons été étonnés d'observer des cellules germinales indifférenciées dans des ovaires fœtaux tardifs et nous nous sommes posé la question des mécanismes impliqués dans la régulation de la transition mitose/méiose dans l'ovaire fœtal humain et du potentiel « souche » de ces cellules indifférenciées. Enfin, au cours de ce travail, nous avons eu l'opportunité d'évaluer l'impact d'un traitement thérapeutique et sa potentielle toxicité sur la lignée germinale.

Ces travaux auront abouti à la publication de deux articles dans des revues internationales à comité de lecture (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism et Molecular Human Reproduction), l'élaboration d'un manuscrit qui sera soumis prochainement et plusieurs communications orales dans des congrès français et internationaux.

- Poulain, M., Frydman, N., Duquenne, C., N'Tumba-Byn, T., Benachi, A., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., Livera, G. (2012). Dexamethasone induces germ cell apotosis in the human fetal ovary. JCEM *97*, E1890-7
- Poulain, M., Frydman, N., Tourpin, S., Souquet, B., Muczynski, V., Benachi, A., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., Livera, G. (2014). Involvement of doublesex and mab-3 related transcription factors (DMRTs) in human female germ cell development demonstrated by xenograft and interference RNA stratégies. MHR doi: 10.1093/molehr/gau058

- Impact de la dexaméthasone sur la lignée germinale femelle. Présentation au Collège de Médecine et Biologie de la Reproduction, Paris, décembre 2012
- Inhibition of *DMRTA2* impairs human female germline development in xenograft. Communication orale, Réunion transversale « différentiation gonadique » INRA, Jouy-en-Josas, 19 mars 2013
- Inhibition of *DMRTA2* impairs human female germline development in xenograft. Communication orale, Congrès « Development and genetics », SFBD/SFG, Avignon 12-15 novembre 2013
- Inhibition of *DMRTA2* impairs human female germline development and meiotic initiation in xenografted ovaries. Communication orale, ESHRE, Munich, 30 juin-3 juillet 2014
- Etude du développement de l'ovaire fœtal humain : intérêt de la xénogreffe. Communication orale, session « graine de chercheurs », FFER, Paris, 18 septembre 2014

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ACVR1 : Activin A receptor, type I = ALK2

ADN : Acide desoxy-ribonucléique

ALDH : Aldehyde déshydrogénase = RALDH

AMH : Anti-Mullerian hormone

AMP : Assistance médicale à la procréation

AP2γ : Activating protein 2 gamma = TFAP2C

AR : Acide rétinoïque

ARN : Acide ribo-nucléique

ARNi : ARN interference

ARNm : Acide ribo-nucléique messager

Aromatase = CYP19A1

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

B

BAX : Bcl2 associated x protein

BCL2 : B-cell lymphoma/leukemia 2

BCL2L1 : BCL2 like 1 = BCLX

BLIMP1 : B-lymphocyte-induced maturation protein 1 = PRDM1

BMP : Bone morphogenetic protein

BOLL : Boule-like RNA-binding protein

BPA : Bisphénol A

BPES : Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus

BrDU : 5-bromo-2-désoxy-uridine

C

CBX2 : Chromobox Homolog 2 = M33

CDB : Cassures doubles brins

CDC6 : Cell division cycle 6

CDK2 : Cyclin-dependent kinase 2

CG : Cellule germinale

CGP : Cellule germinale primordiale

CRABP : Cellular RA-binding protein

CRBP : Cellular rétinol binding protein

CS : Complexe synaptonemal

CTGF : Connective tissue growth factor

CTNNB1 : Catenin (cadherin-associated protein), beta 1 = ß-CAT

CXCR4 : Chemokine (C-X-C motif) receptor 4

CYP19A1 : Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1 = Aromatase

CYP26B1: Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1

D

DAX1 : Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1

DAZ : Delated in azoospermia

DAZL : Delated in azoospermia like

DDX4 : DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 = VASA

DES : diethylstilbestrol

DHH : Desert hedghog

DLL : Delter-like

DMC1 : Dosage supressor of MCK1 homolog

DMR : Differentially methyled regions

DMRT : *Doublesex* and *mab-3*-related transcription factors

DND1 : Dead end homolog 1

DNMT : DNA methyl transferase

DPPA3 : Developmental pluripotency associated 3 = STELLA

DPPA4 : Developmental pluripotency associated 4

DSBR : Double strand break repair model

DUSP6 : Dual specificity phosphatase 6

E

EERβ : Estrogen related receptor beta = ESRRB (NR3B2)

EC : Élément central

EL : Éléments latéraux

EMX2 : Empty spiracles homeobox 2

ESC : Embryonic stem cell

hESC : Humain embryonic stem cell

ESR1 : Estrogen receptor 1 (α) (NR3A1)

ESR2 : Estrogen receptor 2 (ß) (NR3A2)

F

FACS : Fluorescent activated cell sorting

FGF2 : Fibroblast growth factor 2 (basic)

FGF9 : Fibroblast growth factor 9

FGFR2 : Fibroblast growth factor receptor 2

FIGLA : Folliculogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix = FIG-alpha

FKBP5 : FK506-binding protein

FOG2 : Friend of GATA protein 2

FOXL2 : Forkhead box L2

FOXN1 : Forkhead box N1

FOXO3 : Forkhead box O3

FSH : Follicular stimulating hormone

FST : Follistatin

G

GATA4 : GATA binding protein 4

GCNA1 : Germ cell nuclear antigen 1

GDF9 : Growth différentiation factor 9

H

H3K4me2/3 : di-/trimethylation de l'histone H3 sur la lysine 4

H3K9ac : acéthylation de l'histone H3 sur la lysine 9

H3K9me2/3 : di-/triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9

H3K27me2/3 : di-/triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27

H4K16ac : acéthylation de l'histone H4 sur la lysine 16

H4R3me2 : diméthylation de l'histone H4 sur l'arginine 3

hCG : human Chorionic gonadotropin

HMG : High mobility group

HMT : H3K9 methyltransférase

HOXB1 : Homeobox B1

I

IMG : interruption médicale de grossesse

INSL3 : Insulin-like 3

IL2 : Interleukin 2

iPS cell : Induced pluripotent stem cell

IOP : Insuffisance ovarienne prématurée

IVG : Interruption volontaire de grossesse

J

JAG1 : Jagged 1

JPC : Jour post-conception

K

KIT : v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogène homolog = SCFR

KITL : v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogène homolog ligand = SCF

L

LATS2 : Large tumor suppressor kinase 2

LH : Luteinizing hormone

LHX9 : LIM Homeobox 9

LIF : Leukemia inhibitory factor

LIN-28 : Lin-28 Homolog

L-PTGDS : Lipocalin-Prostaglandin D2 synthase

M

MACS : Magnetic activated cell sorting

MAGEA4 : Melanoma associated antigen A4

MCM : Minichromosome maintenance complex

MEI1 : Meiosis inhibitor 1

MEI4 : Meiosis inhibitor 4

miARN : micro-ARN

MIF : Müllerian inhibiting factor

MIS : Müllerian inhibiting substance

MIS : Meiosis-induced substance

MLH1 : MutL homolog 1

MLH2 : MutL homolog 2

MPS : Meiotic-preventing substance

MRe11 : Meiotic recombination 11

MSH4 : MutS homolog 4

MSH5 : MutS homolog 5

MSX : Muscle-segment homeobox

N

NANOG : Nanog homeobox

NANOS : Nanos homolog

NBS1 : Nijmegen breakage syndrome protein 1

NHEJ : Non homologous end joining

NK : Natural killer

NOBOX : NOBOX oogenesis homeobox

NODAL : Nodal

NOTCH: Notch homolog

NR3B3 : Nuclear receptor subfamily 3, group B, member 3 = ERRγ

NR3C1 : Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1

NR5A1 : Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 = SF1

O

OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4 = POU5F1

P

pARNi : petits ARN interférents

PAX6 : Paired box 6

PCB : Polychlorobiphényles

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PCR : Polymerase chain réaction

PE : Perturbateur endocrinien

PGD2 : Prostaglandine D2

PGH2 : Prostaglandine H2

PKA : Protein kinase A

PLZF : Zinc finger and BTB domain containing 16 (ZBTB16)

PMS2 : Postmeiotic ségrégation increased 2

POU5F1 : POU class 5 homeobox 1 = OCT4

PRDM1 : PR domain-containing 1, with ZNF = BLIMP1

PRDM14 : PR domain-containing 14

PRMT5 : Protein arginine methyltransferase 5

PTCH1 : Patched 1

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

PTGDR : Prostaglandin D2 receptor

R

RAD50 : DNA repair protein 50

RAD51 : DNA repair protein 51

RAG1 : Recombination activating gene 1

RAG2 : Recombination activating gene 2

RALDH : Retinaldéhyde déshydrogénase = ALDH

RAR : Retinoic acid receptor

RARE : Retinoic acid response element

RB1 : Retinoblastoma 1

REC8 : Recombinase-8

RH : Recombinaison homologue

RNAseq : Séquençage ARN

ROLDH : Retinol deshydrogenase

ROR2 : Receptor tyrosine kynase-like orphan receptor 2

RSPO1 : R-spondin 1

RXRE : Retinoid X response element

S

SC : Stade de Carnégie

SCF: Stem cell factor = KITL

SCFR : Stem cell facto receptor = KIT

SCID : Severe combined immunodeficiency

SDF1 : Stromal derived factor 1

SDSA : Synthetisis dépendant strand annealing

SF1 : Steroidogenic factor 1 = NR5A1

SG : Semaine de gestation

SiRNA : Small interference RNA

SMAD1 : SMAD (Mothers against decapentaplegic homolog) family member 1

SMAD5 : SMAD (Mothers against decapentaplegic homolog) family member 5

SMC 1β : Structural maintenance of chromosomes 1β

SMC 3 : Structural maintenance of chromosomes 3

SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques

SOX2 : Sex-determining région Y-box 2

SOX9 : Sex-determining région Y -box 9

SPO11 : Sporulation protein homolog 11

SPRY2 : Sprouty homolog 2

SRY : Sex determining region of the Y

SSEA1 : Specific embryonic antigen 1

SSEA4 : Specific embryonic antigen 4

STAG3 : Stromal antigen 3

STELLA = DPPA3

STRA8 : Stimulated by retinoic acid 8

SVF : Sérum de veau fœtal

SYCE1 : Synaptonemal complex central élément 1

SYCE 2 : Synaptonemal complex central élément 2

SYCP1 : Synaptonemal complex protein 1

SYCP 2 : Synaptonemal complex protein 2

SYCP 3 : Synaptonemal complex protein 3

T

TDF : Testis determining factor

TDGF1 : Teratocarcinoma-derived growth factor 1

TDS : Syndrome de dysgénésie testiculaire

TEX 12 : Testis expressed sequence 12

TFAP2C : Transcription factor AP-2 gamma = AP2γ

TGFβ : Transforming growth factor beta

TNFα : Tumor necrosis factor alpha

TNAP : Tissue non specific alkaline phosphatase

TP53 : Tumor protein p53

T-RA : Acide rétinoïque tout-*trans*

V

VASA : Vasa homolog = DDX4

W

WNT4 : Wingless-type MMTV integration site family, member 4

WNT5a : Wingless-type MMTV intégration site family, member 5A

WT1 : Wilms' tumor 1

X

XIC : X inactivation center

XIST : X inactive specific transcript

ß

ß-CAT : ß-catenine = CTNNB1

γ

γH2AX : variant « X » de l'histone 2A phosphorylé en position γ

Numérique

3ß-HSD : 3ß- hydroxysteroid dehydrogenase

5mc : 5-methyl Cytosine

9C-RA : acide rétinoïque 9-*cis*

Note concernant la nomenclature du manuscrit : la nomenclature utilisée pour le manuscrit sera celle recommandée par la HUGOgene database, c'est à dire *GENE1*/PROTEINE1 chez l'Homme et *Gène1*/PROTEINE 1 chez la souris.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS **19**

TABLE DES MATIERES **31**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **35**

FIGURE 28: ASPECT D'UN OVAIRE FOETAL HUMAIN APRES GREFFE ..... 118 ..... **36**

TABLEAU 5: OVAIRES FOETAUX UTILISES EN HISTOLOGIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE 124 **36**

INTRODUCTION **1**

1. GAMETOGENESE, ASPECTS GENERAUX. 3
2. ORIGINE ET MISE EN PLACE DE LA LIGNEE GERMINALE 6
2.1 Approche historique de la mise en place de la lignée germinale *6*
2.1.1 Chez l'Homme 6
2-1-2 Chez la souris 8
2.2 Spécification de la lignée germinale *9*
2.2.1 Induction des CGP 10
2.2.2 Profil d'expression génique associé aux CGP 12
2.2.2.1 Gènes de pluripotence 12
2.2.2.2 Gènes associés à la survie des CGP 13
2.3 Migration des CGP *14*
2.4 Reprogrammation épigénétique *16*
3. DETERMINATION SEXUELLE : « HIGHWAY TO VENUS » 21
3.1 Formation de la gonade indifférenciée *23*
3.2 De la gonade indifférenciée à la gonade sexuellement différenciée *27*
3.2.1. Ontogénèse chez l'Homme 27
3.2.2 Mécanismes de la détermination du sexe somatique 34
3.2.2.1 Différenciation somatique testiculaire 34
3.2.2.2 Différenciation somatique ovarienne 43
3.2.2.3 Antagonisme voie mâle - voie femelle 53
3.2.3 Détermination du sexe germinal 56
3.2.3.1 Morphologie des CGP post-migratoires 57
3.2.3.2 Prolifération/apoptose des gonocytes 58
3.2.3.3 Perte de pluripotence et acquisition des marqueurs de la lignée germinale 60
3.2.3.4 DAZL : le signal de compétence pour la différenciation ? 64
3.2.3.5 Engagement dans la gamétogénèse 65
3.2.3.5.1 Engagement dans la gamétogénèse mâle 65
3.2.3.5.2 Engagement dans la gamétogénèse femelle 67
3.2.3.6 Transition mitose/méiose : les mécanismes moléculaires 68
3.2.3.6.1 Les théories historiques 69
3.2.3.6.2. L'acide rétinoïque, Stimulated by retinoic acid 8 (Stra8) et Cyp26b1 70
3.2.3.6.3 Autres facteurs 77
3.2.3.6.4 Résumé de la détermination sexuelle des CG chez la souris 81
3.2.3.6.5 Données humaines, état des lieux 84
3.2.4 La méiose 86
3.2.4.1 Généralités 86
3.2.4.2 Prophase I de méiose et recombinaison homologue 88
4. LES PERTURBATIONS NON GENETIQUES DU DEVELOPPEMENT OVARIEN 95

PRINCIPALES METHODOLOGIES **101**

CE CHAPITRE PRESENTE LES PRINCIPALES METHODES UTILISEES DANS LES TRAVAUX DE CETTE THESE. IL NE FAIT PAS L'OBJET D'UN CHAPITRE « MATERIEL ET METHODES » EXHAUSTIF, MAIS A POUR BUT DE FACILITER LA COMPREHENSION DU LECTEUR SUR LE CHOIX DES TECHNIQUES MOINS USUELLES ADAPTEES A L'ETUDE DES GONADES HUMAINES. LES ETUDES MENEES EN PARALLELE SUR LES GONADES FŒTALES MURINES, NOUS ONT PERMIS DE CONFIRMER NOS CHOIX EXPERIMENTAUX MENES CHEZ L'HOMME. LA METHODOLOGIE CONCERNANT LES TECHNIQUES CLASSIQUES DE PRELEVEMENT DES GONADES MURINES (GUERQUIN ET AL., 2010) ET ISOLEMENT DES CG CHEZ LA SOURIS (YOSHIMIZU ET AL., 1999) EST DISPONIBLE DANS LES DIFFERENTS ARTICLES DE CE MANUSCRIT. 103

1 PRELEVEMENTS DE GONADES FŒTALES HUMAINES 103
1.1 Contexte *103*
1.2 Isolement des gonades fœtales *104*
2. LA CULTURE ORGANOTYPIQUE DE GONADES FŒTALES 106
2.1 Approche historique *106*
2.2 Culture d'ovaires foetaux *108*
2.2.1 Méthode de culture 108
2.2.2 Réactifs utilisés 109
3. GREFFE D'OVAIRES FŒTAUX 112
3.1 Les modèles de xénogreffe de gonades humaines existants *112*
3.2 Modèle mis au point au laboratoire *114*
3.2.1 Mise au point de la greffe 114
3.2.2 Protocole de greffe 118
3.2.1.1 Animaux 118
3.2.1.2 Mode opératoire de la greffe 118
3.3 Protocole d'ARN interférence *119*
3.3.1 Choix des siRNA 119
3.3.2 Validation in vitro des siRNA 119
3.3.3 Xénogreffe couplée à une stratégie d'ARN interférence 120
4. ANALYSES HISTOLOGIQUES 121
4.1 Fixation des tissus et montage sur lame *121*
4.2 Identification des CG, comptages cellulaires *121*
4.3 Immunohistochimie *122*
5. ANALYSE D'EXPRESSION DE GENES 123
5.1 Extraction des ARN et retro-transcription *123*
5.2 PCR quantitative *125*
OBJECTIFS DES TRAVAUX 127
RESULTAT 1: 131
RESULTATS 2 155
RESULTATS 3 181
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 195
BIBLIOGRAPHIE 211

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : Schéma récapitulatif des grandes étapes du cycle reproductif chez l'Homme. 5
FIGURE 2 : Chronologie du développement des cellules germinales primordiales chez l'Homme. 8
FIGURE 3 : Principaux tissus et BMP impliqués dans l'induction des CGP chez la souris en comparaison avec le schéma hypothétique d'induction des CGP chez l'Homme. 12
FIGURE 4 : Reprogrammation épigénétique, timing chez la souris 18
FIGURE 5 : Représentation schématique de la chronologie du développement des CGP chez la souris et l'Homme. 20
FIGURE 6 : Détermination sexuelle chez l'Homme 23
TABLEAUX 1A ET 1B : Principaux gènes impliqués dans le développement de la gonade indifférenciée 26
Figure 7 : Etapes de la différenciation gonadique en testicule ou ovaire 29
FIGURE 8 : Comparaison entre le développement ovarien murin et humain 31
FIGURE 9 : Le développement des gonades et de leurs canaux chez les mammifères 33
FIGURE 10: Contrôle génétique de la détermination du sexe masculin chez la souris 40
FIGURE 11 : Rôle central des cellules de Sertoli dans la différenciation testiculaire 42
FIGURE 12 : Contrôle génétique de la détermination ovarienne chez la souris 48
FIGURE 13 : Principales lignées cellulaires dans les gonades fœtales femelle et mâle et leurs précurseurs 53
FIGURE 14 : Schéma résumant l'antagonisme des voies de différenciation somatique mâle/femelle 55
FIGURE 16 : Principaux facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération des CG 59
FIGURE 17 : Ontogénèse des marqueurs des cellules germinales dans l'ovaire fœtal humain 63
FIGURE 18 : Représentation schématique des étapes de différenciation des CG dans les gonades humaines 68
FIGURE 19 : Métabolisme de l'acide rétinoïque 71
FIGURE 20 : Représentation schématique de l'initiation de la méiose par la voie de l'AR 73
FIGURE 21 : Schéma récapitulatif du rôle de la voie des rétinoïdes dans la transition mitose/méiose 77
FIGURE 22 : Résumé des potentiels acteurs responsables de la dichotomie ovogénèse/spermatogénèse 83
FIGURE 23 : La méiose chez l'Homme, description générale 87
FIGURE 24 : Description de la prophase I de méiose. 91
FIGURE 25 : Représentation schématique de la réparation des cassures doubles brins de l'ADN par recombinaison homologue. 93
FIGURE 26 : Modèle de culture organotypique utilisé au LDG 109
FIGURE 28: Aspect d'un ovaire foetal humain après greffe 118

TABLEAU 5: Ovaires foetaux utilisés en histologie et biologie moleculaire 124

INTRODUCTION

1. Gamétogénèse, aspects généraux.

La Reproduction est un processus fondamental qui permet à une espèce de se perpétuer en donnant naissance à de nouveaux organismes. Au cours de la Reproduction dite sexuée, le nouvel individu est obtenu à partir de cellules reproductrices. Le processus de gamétogénèse va permettre la production de cellules reproductrices haploïdes et fonctionnelles (contenant un seul exemplaire de chaque chromosome, soit n chromosome). Ces cellules sont appelées gamètes (des noms gamétês et gamétis, désignant respectivement en grec ancien l'époux et l'épouse) et la réduction chromosomique est possible grâce à une division cellulaire particulière : la méiose. La méiose permet une diversification génétique par la production de cellules haploïdes qui devront, en général, fusionner au cours de la fécondation avec les cellules haploïdes d'un autre individu de sexe différent pour former un zygote diploïde (contenant deux exemplaires de chaque chromosome soit 2n chromosomes). Le développement de ce zygote donnera naissance à un nouvel organisme. Des recombinaisons génétiques au cours de la méiose permettent la production de cellules haploïdes légèrement différentes les unes des autres chez un même individu, mais issues d'un même précurseur et favorisent ainsi la diversification de l'espèce (Figure 1).

Chez l'Homme, les gamètes sont produits dans les gonades, organes sexuellement différenciés en fonction du sexe chromosomique : ovaire chez l'individu XX ou testicule chez l'individu XY. Les gonades permettent la fonction de reproduction par la synthèse d'hormones sexuelles (fonction endocrine) et la fabrication de gamètes (fonction exocrine). Les gonades se forment en début de vie fœtale et sont alors sexuellement indifférenciées. Elles sont dites bipotentielles, capables de se différencier en testicule ou ovaire en fonction du sexe chromosomique de l'individu. Avant la formation des gonades, dès les premiers jours de vie fœtale, une population cellulaire particulière émerge : ce sont les cellules germinales primordiales (CGP), précurseurs des cellules germinales (CG). Ces CGP migrent de leur lieu de spécification jusqu'aux gonades indifférenciées qu'elles colonisent. Les cellules somatiques de la gonade vont ensuite se différencier en fonction du sexe chromosomique de l'individu pour former des testicules chez le mâle (XY) ou des ovaires chez la femelle (XX). Sous l'influence de l'environnement somatique, les CG vont se différencier à leur tour. Si elles empruntent la voie mâle, les CG se multiplient puis entrent en quiescence pendant la vie fœtale. A partir de la puberté, les CG vont se diviser de nouveau et entrer en méiose pour produire en continu les gamètes mâles, mobiles, appelés spermatozoïdes. Chez la femelle,

toutes les CG vont entrer en méiose pendant la vie fœtale et se bloquer en fin de prophase de première division méiotique. Les gamètes femelles formés, appelés ovocytes, sont ensuite entourés par des cellules somatiques pour former des follicules. Le nombre de follicules est déterminé à la naissance et ne cessera de décroitre au cours de la vie. La femme produira à partir de la puberté un seul ovocyte fécondable par cycle menstruel jusqu'à épuisement du stock ovocytaire au moment de la ménopause.

A partir de CGP indifférenciées qui colonisent une gonade bipotentielle, on observe une détermination très différente des cellules en fonction du sexe de l'individu : l'ovogénèse dans les ovaires et la spermatogénèse dans les testicules. Ces deux processus partagent des étapes communes comme la prolifération des CG et la méiose mais diffèrent significativement. Ces différences expliquent en partie l'anisogamie. En effet, chez la femelle la méiose est discontinue, commence pendant la vie fœtale et ne finit réellement qu'au moment de la fécondation si elle a lieu. La méiose est asymétrique avec l'obtention d'un seul ovocyte à partir d'une CG. Et le stock d'ovocytes est déterminé dès la fin de vie fœtale. Chez le mâle, la méiose ne débute qu'à la puberté, est continue et symétrique avec l'obtention de quatre spermatozoïdes à partir d'une CG. La persistance de cellules germinales souches à l'âge adulte confère au mâle la possibilité de produire un nombre illimité de gamètes durant toute sa vie. Les grandes étapes de différenciation de la lignée germinale, méiose et production de gamètes sont communes chez le mâle et la femelle mais ont lieu à des moments du développement et avec des cinétiques très différentes. Cela laisse supposer que les mécanismes de régulation de ces grandes étapes diffèrent entre les individus mâles et femelles.

Le déroulement correct des différentes étapes de la gamétogénèse, la formation de la gonade et le dialogue entre les cellules germinales et leur environnement somatique conditionne la fertilité de l'individu. La mise en place de la lignée germinale est longue puisqu'elle débute pendant la vie fœtale pour se continuer à l'âge adulte. Les cellules germinales ayant le potentiel de reformer un individu et de pérenniser l'espèce, il est donc crucial qu'au cours de leur longue différenciation depuis le stade de cellules germinales primordiales jusqu'aux gamètes, elles soient porteuses d'un génome intact et d'une information épigénétique adéquate. La survenue d'erreurs quel que soit le moment du développement (spécification des cellules germinales, migration, différenciation, maintien à l'âge adulte) peut conduire à des effets désastreux comme la perte de ces cellules (stérilité) ou une prolifération anormale (cancers germinaux). Par exemple, chez l'homme, des délétions dans la région AZF

(azoospermia factor) du chromosome Y peuvent conduire à la perte de gènes nécessaires à la différenciation testiculaire et jusqu'à une absence totale de cellules germinales dans le testicule adulte en fonction de la région délétée (Syndrome Sertoli-cell only).

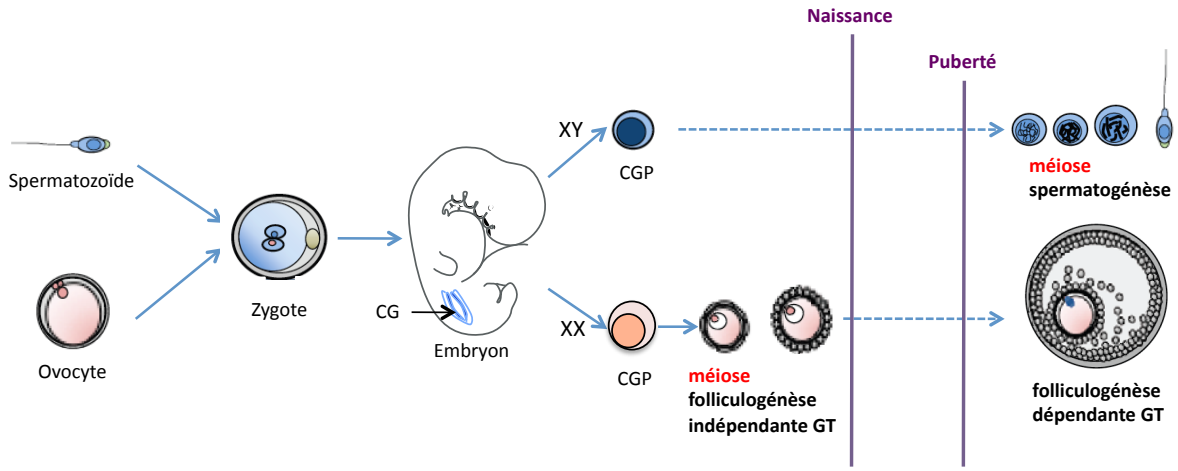


FIGURE 1 : Schéma récapitulatif des grandes étapes du cycle reproductif chez l'Homme.
De la fécondation, mise en place de la lignée germinale dans l'embryon, à la formation des gamètes pouvant redonner un nouvel individu. GT pour gonadotrophines, images tirées de Saitou et al. (2012).

2. Origine et mise en place de la lignée germinale

Ce chapitre est destiné à améliorer la compréhension des travaux présentés dans le deuxième article de cette thèse. Il permet de poser l'état des connaissances sur le sujet et d'orienter le lecteur sur le choix des marqueurs étudiés dans nos travaux pour soutenir l'hypothèse d'une persistance de CG « souches » dans l'ovaire fœtal humain à des stades tardifs du développement.

Les précurseurs des cellules germinales primordiales s'individualisent très tôt au cours du développement embryonnaire (avant la gastrulation) et se spécifient au niveau de l'épiblaste. L'hypoblaste et l'épiblaste constituent les deux premiers tissus différenciés de l'embryon et le fœtus se développe par la différenciation de l'épiblaste. Les CGP se localisent ensuite dans une région extra-embryonnaire où elles continuent leur différenciation, puis réintègrent l'embryon au cours de la gastrulation et migrent vers la gonade en formation, lieu de différenciation finale. Au cours de cette migration, les CGP prolifèrent et subissent un important remaniement de leurs programmes génétique et épigénétique (réactivation des gènes de pluripotence, expression d'un programme génétique germinal spécifique et reprogrammation épigénétique). Dans ce chapitre, nous présenterons les mécanismes impliqués dans l'induction des CGP dans l'épiblaste jusqu'à leur arrivée dans la gonade indifférenciée. L'accès difficile au matériel d'étude humain, en particulier à des stades très précoces du développement embryonnaire, limite la connaissance des mécanismes impliqués chez l'Homme. C'est pourquoi nous décrirons ces mécanismes également à partir des études réalisées chez un autre mammifère, la souris.

Note : pour faciliter la lecture de ce chapitre nous avons choisi d'utiliser le terme CGP (cellule germinale primordiale) tant que les cellules n'ont pas atteint la gonade indifférenciée et CG (cellule germinale) lorsque les cellules l'ont colonisée.

2.1 Approche historique de la mise en place de la lignée germinale

2.1.1 Chez l'Homme

Les premières descriptions histologiques des CGP datent du début du XX^{ème} siècle et font suite à des travaux réalisés en premier chez l'Homme. Fuss et Felix les décrivent comme de grandes cellules rondes localisées dans l'endoderme de la vésicule vitelline dans des

embryons de 23 à 26 jours post conception (jpc) (Felix, 1911 ; Fuss, 1911; Fuss, 1912). A ce stade embryonnaire, les CGP sont observées en position extra-embryonnaire. Plus tard, les travaux réalisés par Politzer et Witschi sur un plus grand nombre d'embryons confirment ces résultats (Politzer, 1928; Politzer, 1930; Politzer, 1933; Witschi, 1948). Les deux auteurs localisent les CGP dans des embryons humains d'environ 23 à 26 jpc (stade de Carnegie (SC) 11) au niveau de la vésicule vitelline, près de la jonction avec l'allantoïde. Ils décrivent la migration des CGP le long du canal vitellin, canal subsistant provisoirement entre la vésicule vitelline et l'intestin au cours de la délimitation embryonnaire, puis le long du mésentère dorsal, qui rattache l'intestin à la paroi abdominale, vers les crêtes génitales, destination finale des CGP. Les CGP sont progressivement retrouvées à la fois dans la vésicule vitelline et dans l'intestin primitif puis uniquement dans l'intestin primitif vers 26-30 jpc (SC 12). Vers 37 jpc (SC 16), toutes les CGP sont localisées au niveau des crêtes génitales. Witschi décrit qu'au cours de leur migration, l'aspect des CGP se modifie et qu'elles présentent notamment des pseudopodes leur conférant un mouvement amiboïde. Il suggère que le mouvement migratoire des CGP pourrait être dû à une locomotion active grâce à ces pseudopodes. Cette hypothèse sera confirmée 50 ans plus tard chez la souris (Molyneaux et al., 2001). Les auteurs notent également qu'au cours de leur migration, le nombre de CGP augmente considérablement. Leur hypothèse serait une multiplication des CGP spécifiées initialement au cours de leur migration et non une formation secondaire de CGP à partir d'autres territoires embryonnaires. Politzer dénombre 40 CGP dans un embryon humain d'environ 3 semaines de gestation (sg) et plus de 600 dans un embryon de 4 sg. Witschi retrouve de façon similaire 30-50 CGP dans un embryon à la fin de la 3ème semaine de gestation et plus de 100 CGP quelques jours plus tard. Les comptages cellulaires sont ensuite facilités par les premiers marquages histochimiques des CGP par marquage de l'activité de la Tissue non specific alkaline phosphatase (TNAP) améliorant le repérage de ces cellules et confirmant les données précédentes (McKay et al., 1953).

Ainsi, les CGP prolifèrent et colonisent la gonade indifférenciée entre la 5ème et la 6ème semaine de gestation, où elles contribuent à la formation de la gonade. A partir de la 7ème semaine de gestation, les cellules somatiques de la gonade se différencient entrainant une différenciation sexuelle de la gonade en testicule ou en ovaire (Figure 2) (Hanley et al., 2000). Les CG mâles et femelles, initialement d'aspect identique, se différencient en fonction de l'environnement somatique et vont subir des destins différents : l'initiation de la méiose chez

la femelle vers 10 sg (Gondos et al., 1986) et une potentielle entrée en quiescence chez le mâle (Gaskell et al., 2004). Nous détaillerons plus loin ces évènements (paragraphe 3.2.3.5.1).

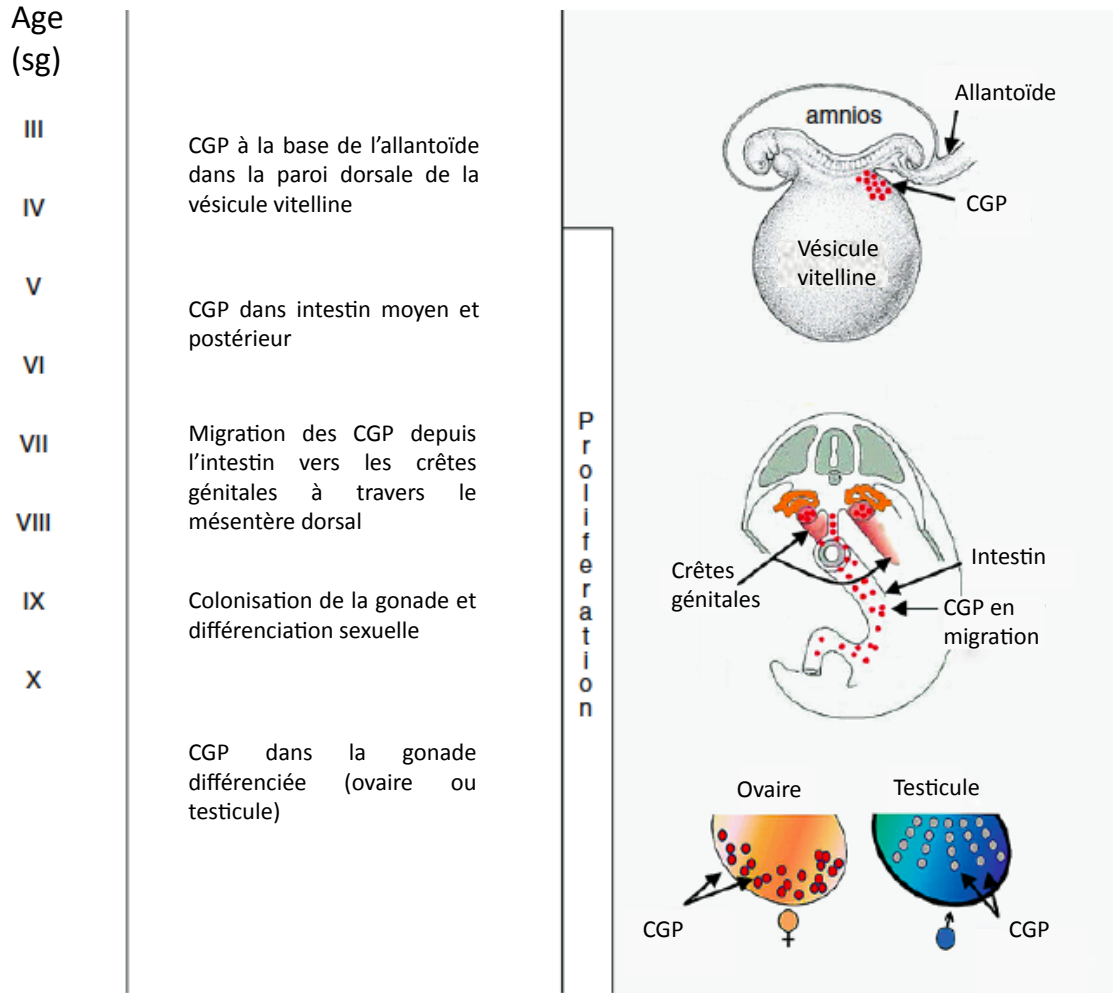


FIGURE 2 : Chronologie du développement des cellules germinales primordiales chez l'Homme.

Schéma récapitulatif de la spécification et migration des CGP durant leur migration dans l'embryon jusqu'aux crêtes génitales au cours du premier trimestre de gestation (De Felici, 2013).

2-1-2 Chez la souris

Chiquoine est le premier à utiliser un immunomarquage de la TNAP pour identifier les CGP dans des embryons de souris (Chiquoine, 1954). Il les retrouve, dans des embryons de 8 jpc, au niveau de l'allantoïde et du mésoderme de la vésicule vitelline, comme décrit précédemment chez l'humain. Chez la souris, un trajet de migration identique à celui décrit chez l'humain est retrouvé avec une localisation des CGP dans l'intestin primitif à 8,5 jpc

(~100 cellules), le passage dans le mésentère dorsal pour coloniser la gonade indifférenciée entre 10,0 et 11,0 jpc. A 12,5 jpc, les gonades sont somatiquement différenciées en testicule ou ovaire et l'on compte environ 6000 CG dans les gonades à 13,5 jpc (Pepling and Spradling, 2001).

Progressivement, grâce au développement des techniques de microscopie (microscopie électronique, whole-mount et microscope confocal) et l'utilisation de marqueurs plus précoces, les CGP sont repérées dès 7,0 jpc au niveau de l'extrémité caudale de la ligne primitive, dans le mésoderme extra-embryonnaire (Ginsburg et al., 1990). Enfin, par l'utilisation de souris transgéniques, les premières CGP (une vingtaine) ont pu être identifiées dans des embryons de 6,25 jpc au niveau de l'épiblaste embryonnaire grâce à l'insertion du gène codant pour une protéine fluorescente dans le promoteur d'un gène spécifique des CGP (Ohinata et al., 2005; Yamaji et al., 2008). Les CGP migrent alors depuis l'épiblaste vers la paroi de la vésicule vitelline et se rassemblent à l'abouchement de l'allantoïde. Elles ont donc une origine embryonnaire puis sont transitoirement localisées en position extra-embryonnaire et réintègrent l'embryon au cours de leur migration vers les crêtes génitales.

2.2 Spécification de la lignée germinale

Chez la plupart des organismes, invertébrés ou vertébrés non mammaliens, la différenciation germinale se fait dans la cellule œuf au niveau du plasme germinatif qui contient des ARNm, des protéines de liaison à l'ARN et des organites hérités de la mère. Les cellules qui héritent du plasme germinatif au cours des divisions cellulaires prennent un destin germinal. Les autres cellules prennent un destin somatique. C'est le cas chez le nématode où dès les premières divisions de l'œuf, les cellules « pré-germinales » sont déterminées (pour revue Ikenishi, 1998). Chez les mammifères, l'émergence des CGP est induite par un signal diffusible au sein d'un tissu et les cellules sensibles à ce signal prendront un destin germinal. C'est l'environnement somatique qui dicte l'émergence des CGP, comme l'ont montré Tam et Zhou par leurs expériences de transplantations d'épiblaste distal en position proximale (Tam and Zhou, 1996). Chez la souris, il a été montré que les CGP étaient induites dans l'épiblaste proximal postérieur embryonnaire sous l'action d'un signal spécifique de type Bone morphogenetic protein (BMP) sécrété par l'ectoderme extra-embryonnaire (pour revue De Felici, 2009; Saitou, 2009). Les mécanismes d'induction des premières CGP, leur

spécification et les marqueurs cellulaires associés à ce destin germinal au cours de l'induction et la migration des CGP vont être détaillés.

2.2.1 Induction des CGP

Le rôle critique des BMP dans le signal d'induction des CGP depuis l'épiblaste a été mis en évidence par des études d'invalidation génique chez la souris. BMP4 et 8b sont secrétées par l'ectoderme extra-embryonnaire et les souris invalidées pour ces gènes présentent une absence totale de CGP (Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000). BMP2 est secrétée par l'endoderme viscéral dès 5,5 jpc. Cette cytokine présente une structure similaire à celle de BMP4 avec qui elle agirait en synergie (Ying and Zhao, 2001) (Figure 3). De plus, les souris hétérozygotes pour chaque membre de la famille des BMP, présentent un nombre réduit de CGP (Ying and Zhao, 2001) ainsi que celles hétérozygotes pour le récepteur de type 1 aux BMP, l'Activin A receptor, type I (ACVR1 ou ALK2) (de Sousa Lopes et al., 2004). Ce même phénotype est retrouvé chez les souris hétérozygotes pour les transducteurs intracellulaires du signal BMP, SMAD1 (Mothers against decapentaplegic homolog family member 1) (Tremblay et al., 2001) et SMAD5 (Chang and Matzuk, 2001) (figure 3).

Des cultures *in vitro* d'épiblaste ont permis d'établir un scénario de signalisation de spécification des CGP. Ainsi BMP4 est suffisant pour induire des CGP-like qui pourront ensuite être différenciées en gamètes compétents pour l'obtention de portées en bonne santé (Ohinata et al., 2009). Plus récemment, cette stratégie a été utilisée pour induire des CGP à partir de cellules souches embryonnaires (ESC) (Hayashi et al., 2011). Les cellules sensibles au signal BMP expriment le gène *B-lymphocyte-induced maturation protein 1* (*Blimp1*), un régulateur de la transcription contenant un domaine PR (PDRI-BF1 and RIZ) également appelé *Prdm1*. L'expression des gènes *Prdm14*, *Fragilis*, *Stella*, *Transcription factor AP-2 gamma* (*Tfap2c*/*AP2γ*) et *Lin-28 Homolog* (*Lin-28)* a été décrite dans les CGP. Tous ces gènes ont une fonction au cours de la spécification des CGP et peuvent être utilisés pour marquer et tracer ces cellules. Cependant, une récente étude a montré que les gènes *Blimp1* (répression du programme somatique), *Prdm14* (ré-acquisition du potentiel de pluripotence) et *Tfap2c* (suppression de la différenciation du mésoderme) sont suffisants seuls pour activer le programme clef nécessaire à la formation de CGP (Nakaki et al., 2013). L'expression de ces trois facteurs de transcription peut suffire pour activer *in vitro* des CGP à partir de cellules

induites artificiellement en cellules de type épiblastique (« epiblast-like ») capables de donner ensuite des gamètes compétents et une nouvelle génération de souris.

Chez l'Homme, on note un manque de données retraçant les premiers stades de l'origine de la lignée germinale. Aucune information n'est disponible concernant le processus d'induction des CGP, le contrôle de leur spécification et leur détermination. Le signal diffusible BMP provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire et agissant sur l'épiblaste proximal postérieur est cependant largement conservé. Il est notamment décrit chez d'autres mammifères comme le lapin (Hopf et al., 2011). On peut penser qu'il est également conservé chez l'Homme malgré un mode de formation des tissus extra-embryonnaires lègerement différent de celui observé chez la souris (Figure 3). L'expression de *LIN-28* (Gillis et al., 2011; Childs et al., 2012), *BLIMP1* (Eckert et al., 2008) et *TFAP2C* (Pauls et al., 2005) a été rapportée dans des embryons humains de 6 à 10 sg. L'équipe d'Anderson retrouve l'expression de *BMP2*, *BMP4*, *SMAD1* et *SMAD5* à tous les stades analysés dans des ovaires fœtaux de 8 à 20 sg (Childs et al., 2010). Même si ces études analysent des embryons après la période de spécification des CGP, elles apportent la preuve de l'expression de ces gènes dans la gonade fœtale humaine.

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des CGP humaines, les systèmes de culture *in vitro* de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ou de cellules souches pluripotentes induites (iPS) ont été développés. Ainsi il a été mis en évidence que les BMP étaient capables d'induire la formation de CGP *in vitro* et que l'ajout de facteurs comme le Fibroblast growth factor 2 (FGF2) permettaient d'améliorer considérablement le nombre de CGP produites *in vitro* (Kee et al., 2006; West et al., 2008; Hiller et al., 2011). En revanche, aucune de ces études ne rapporte l'obtention de gamètes humains compétents.

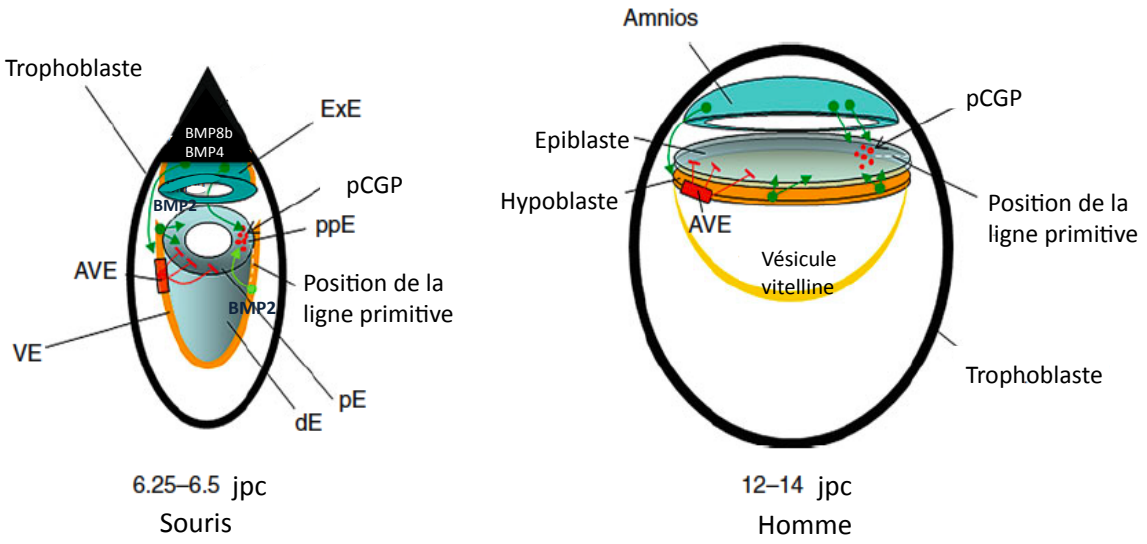


FIGURE 3 : Principaux tissus et BMP impliqués dans l'induction des CGP chez la souris en comparaison avec le schéma hypothétique d'induction des CGP chez l'Homme.

Chez la souris, à 6.25 jpc, moins de 10 précurseurs des CGP (pCGP), émergent au niveau de l'épiblaste postérieur proximal (ppE) près de la région de formation de la ligne primitive. BMP4 et BMP8b sécrétés par l'ectoderme extra-embryonnaire (ExE) et BMP2 produit par l'endoderme viscéral (VE) induisent la formation des CGP. Le signal BMP étant diffusible et l'induction des précurseurs des CGP localisé au ppE, on suppose que l'endoderme viscéral antérieur (AVE) sécrète un signal diffusible répresseur. dE pour ectoderme distal et pE pour ectoderme proximal.

L'expression de Blimp1 suivie de Prdm14 et de la sur-régulation de Fragilis marque l'émergence des précurseurs des CGP. Les cellules expriment ensuite Stella et Tfap2c et à 7.25 jpc, les précurseurs des CGP sont spécifiés en CGP dans le mésoderme extra-embryonnaire, à la base de l'allantoïde. Un cluster d'environ 40 CGP exprimant fortement Tnap et Stella se forme.

Chez l'Homme les premières CGP ont été décrites à partir de 21 jpc au niveau de l'allantoïde. A 14 jpc, l'embryon humain est discoïde et bilaminaire : l'épiblaste et l'hypoblaste ou endoderme primitif. La cavité amniotique se forme, bordée par les cellules de l'amnios qui dérivent de l'épiblaste. A l'autre pôle, les cellules de l'hypoblaste migrent le long de la membrane de Heuser pour former la vésicule vitelline. Au début de la troisième semaine de gestation, la ligne primitive apparaît et la gastrulation débute. Chez l'Homme, on ne retrouve pas de structure correspondant à l'ExE murin et le l'apparition du mésoderme extra-embryonnaire semble plus précoce (De Felici, 2013).

2.2.2 Profil d'expression génique associé aux CGP

2.2.2.1 Gènes de pluripotence

Chez la souris, on observe un maintien de l'expression de l'ensemble du réseau de gènes de pluripotence dans les CGP tels que *Specific embryonic antigen 1* (*Ssea1*) et 4 (*Ssea4*), le proto-oncogène *Stem cell factor receptor* (*Scfr*/*Kit*) et plus particulièrement *Octamer-binding transcription factor 4* (*Oct4*), *Sex-determining région Y-box 2* (*Sox2*) et *Nanog homeobox* (*Nanog*) (Scholer et al., 1990; Pesce et al., 1998; Kehler et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005; Chambers et al., 2007). A partir de 6,75 jpc, les CGP perdent l'expression du facteur

somatique *Homeobox B1* (*HoxB1*) au profit de l'expression de *Blimp1*. Au cours de cette transition, les gènes de différenciation somatique sont réprimés sous l'action de *Blimp1* (Ohinata et al., 2005; Kurimoto et al., 2008b; Kurimoto et al., 2008a). Rapidement après l'expression de *Blimp1*, l'expression de *Prdm14* est nécessaire à l'acquisition d'un potentiel de pluripotence en potentialisant l'expression de gènes tels que *Sox2*, *Dppa3*/*Stella*, *Dppa4* et *Tdgf1* (Yamaji et al., 2008). Enfin, *Tfap2c*, cible potentielle de *Blimp1*, est exprimé à partir de 7,25 jpc. *Tfap2c* agirait en aval de *Blimp1* pour réprimer le programme somatique (Weber et al., 2010). L'expression de ces gènes est progressivement restreinte aux CGP et devient spécifique de la lignée germinale à partir de 8,0 jpc (Yabuta et al., 2006).

Chez l'Homme, les CGP expriment les facteurs de pluripotence clés tels que *OCT4* et *NANOG* (Rajpert-De Meyts et al., 2004). Il est décrit également l'expression du récepteur à tyrosine-kinase *KIT* (Hoyer et al., 2005), ainsi que l'expression de *SSEA1* et *SSEA4* (Gaskell et al., 2004; Kerr et al., 2008b; Mollgard et al., 2010). En revanche, le marqueur *SOX2*, largement décrit chez la souris comme acteur de la triade de pluripotence avec *Oct4* et *Nanog*, n'a pas été retrouvé chez l'Homme (Perrett et al., 2008). Dans cette étude, les prélèvements les plus jeunes ont été estimés à 48 jpc. Si l'on estime que les CGP avant ce stade n'expriment pas *SOX2*, cela montre une importante différence dans le profil d'expression des gènes de spécification entre l'Homme et la souris.

2.2.2.2 Gènes associés à la survie des CGP

Les protéines NANOS (Nanos homolog) sont des protéines de liaison aux ARN dont le rôle de régulation du développement de la lignée germinale est conservé au cours de l'évolution (Tsuda et al., 2003). Chez la souris, les CGP expriment *Nanos3* à partir de 7,5 jpc. *Nanos3* semble requis à partir de 9,5 jpc pour la survie des CGP au cours de la migration. On retrouve peu de CGP à 12,5 jpc chez les souris invalidées pour *Nanos3* et la double invalidation $Nanos3^{-/-}$; $Bax^{-/-}$ permet de restaurer en partie la fertilité des souris. L'invalidation de *Nanos3* entraîne la mort des CGP au cours de la migration par des voies d'apoptose dépendantes et indépendantes de la voie BAX. En revanche, l'absence d'un signal *Nanos 3* n'empêche pas les CGP de migrer jusqu'aux gonades (Suzuki et al., 2008).

Une mutation spontanée appelée «Ter» dans la séquence du gène *Dead end homolog 1* (*Dnd1*) a été identifiée et induit la formation de tératomes testiculaires (Cook et al., 2009). DND1 est

une protéine de liaison aux ARN jouant un rôle dans la survie des CGP (Weidinger et al., 2003; Horvay et al., 2006). Dans les souris *Dnd1*$^{ter/ter}$ une diminution du nombre de CGP est observable dès 8,0 jpc et un très faible nombre de CGP arrivent jusqu'aux gonades à 13,5 jpc (Youngren et al., 2005; Cook et al., 2009). Des études sur la fonction moléculaire de DND1 mettent en évidence que DND1 empêche la fixation de micro-ARN (miARN) et donc, par conséquent, autorise la traduction de certains ARNm (Kedde et al., 2007). De plus, il a été montré que DND1 est capable de se fixer sur les ARNm de gènes de pluripotence (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin-28*), de cycle cellulaire (*Tp53*, *Lats2*) et d'apoptose (*Bclx*, *Bax*) (Zhu et al., 2011). En absence de *Dnd1* ces gènes pourraient être la cible de mi-ARN, induisant alors leur dégradation, ce qui modifierait le destin des CGP, pouvant alors expliquer le phénotype des souris Ter.

2.3 Migration des CGP

Les CGP doivent ensuite atteindre la gonade où elles trouveront l'environnement nécessaire pour se différencier.

Chez l'humain, il a été décrit, à partir de 4 sg, une première migration passive des CGP de la vésicule vitelline vers l'endoderme intestinal ventral grâce aux mouvements morphogéniques. Cette migration se ferait passivement par incorporation d'une partie de l'endoderme de la vésicule vitelline dans l'ébauche de l'intestin primitif au cours de l'organogénèse. La deuxième phase de migration se ferait à la fois grâce à la croissance embryonnaire et *via* des mécanismes actifs. Vers 5 sg, les CGP atteignent le mésentère dorsal puis colonisent le mésothélium cœlomique qui recouvre le mésonéphros. L'arrivée des premières CGP dans l'ébauche gonadique s'observe vers 6 sg (Motta and Makabe, 1982).

La migration des CGP est un processus important requérant des mécanismes actifs tels que la régulation de la direction et de la survie de ces cellules. En effet, une migration inadéquate peut entraîner une dégénérescence des CGP et un défaut de colonisation de la gonade pouvant engendrer une infertilité. Un certain nombre de CGP se perdent au cours de la migration et n'atteignent pas la gonade. Normalement, ces CGP entrent en apoptose (Molyneaux et al., 2001). La non élimination de ces CGP ectopiques peut conduire à la formation de tumeurs germinales de localisation extra-gonadique (Schneider et al., 2001). Plusieurs mécanismes ne

s'excluant pas nécessairement ont été avancés pour expliquer la migration des CGP de l'intestin à la gonade indifférenciée :

1. Le premier mécanisme est celui d'un mouvement propre aux CGP qui leur permettrait une locomotion active. Les CGP émettent des pseudopodes pendant leur migration (Witschi, 1948; Fujimoto et al., 1977) et les expériences en « time-lapse » chez la souris de Molyneaux et col. (Molyneaux et al., 2001) confirment que les CGP atteignent la gonade indifférenciée par des mouvements actifs. Cependant, ce mouvement ne peut expliquer à lui seul l'orientation des CGP pendant la migration.

2. Les CGP seraient guidées par les cellules somatiques et/ou des éléments de la matrice extracellulaire exprimés de façon spatio-temporelle sur leur trajet. Certaines études chez la souris montrent que les CGP utiliseraient différentes intégrines pour se lier aux composants de la matrice extra-cellulaire comme la fibronectine, la laminine et le collagène de type IV (pour revue Richardson and Lehmann, 2010).

3. Enfin, une migration dépendante d'un chimiotactisme (signaux d'attraction/répulsion) est proposée. Un signal diffusible produit par les crêtes génitales guiderait les CGP pour qu'elles migrent correctement jusqu'aux gonades indifférenciées. Chez la souris le Transforming growth factor beta (TGF-β), le Stromal derived factor 1 (SDF1) et le Stem cell factor (SCF/KITL) ont été proposés en tant que chémo-attracteurs (Godin and Wylie, 1991; Doitsidou et al., 2002; Farini et al., 2007). Une étude récente rapporte également le rôle du récepteur kinase ROR2 et son ligand Wingless-type MMTV intégration site family, member 5A (WNT5a) dans la migration des CGP. La distribution asymétrique de ROR2 sur les CGP amplifierait leur réponse au signal KITL et polariserait la migration des CGP (Laird et al., 2011). Chez l'humain, les CGP expriment le récepteur à tyrosine-kinase KIT (Hoyer et al., 2005) et les CGP-like dérivées d'hESC expriment *CXCR4 (Chemokine (C-X-C motif) receptor 4)*, le récepteur au SDF1 (Bucay et al., 2009). Un mécanisme de chimiotactisme a également été proposé comme support de la migration des CGP chez l'humain (Matsui et al., 1990; Richardson and Lehmann, 2010). Il a été montré que le système nerveux entérique exprimait *KITL* (Hoyer et al., 2005), ce qui pourrait supporter l'hypothèse d'une migration des CGP le long des fibres du système nerveux autonome (Mamsen et al., 2012).

Les mécanismes impliqués dans la migration des CGP sont vraisemblablement complexes et résultent de mouvements morphogéniques, de l'interaction des CGP avec la matrice extracellulaire et de signaux d'attraction. Des signaux de répulsion jouent également très

certainement un rôle dans l'orientation de la migration des CGP, mais aucun n'a pour l'instant été mis en évidence.

2.4 Reprogrammation épigénétique

L'accès aux gènes et le contrôle de leur transcription est possible ou non en fonction de l'environnement chromatinien de ces gènes. L'état de méthylation de l'ADN, par la méthylation des cytosines en position 5 (5-méthyle Cytosine, 5mC), ou la modification post-traductionnelle des histones et l'existence de différents variants d'histones, va moduler cet environnement et l'état transcriptionnel de la chromatine. Ce sont les marques épigénétiques qui modulent l'expression des gènes. On distingue plusieurs niveaux de modulation épigénétique dont : i) une empreinte épigénétique globale, ii) une empreinte épigénétique parentale et iii) l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femelle. Ces trois marques épigénétiques sont celles qui nous intéressent pour la différenciation des cellules germinales mais il existe d'autres mécanismes de régulation du génome comme les ARN non codants (miARN, pARNi…) ou l'état de méthylation des séquences répétées et transposons.

L'empreinte épigénétique globale est présente sur tout le génome mais peut différer d'un type cellulaire à un autre. Différentes marques épigénétiques sont retrouvées comme la méthylation des cytosines des dinucléotides CpG en position 5 (5mC) possible grâce à des ADN méthyltransférases (DNMT). Cette méthylation réprime l'expression des gènes concernés. Des modifications post-traductionnelles des histones comme des méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination de certains acides aminés vont autoriser ou bloquer l'accès à la chromatine dans certaines régions. Par exemple, les marques H3K4me2/3, H3K9ac ou H4K16ac vont permettre la transcription des gènes alors que H3K9me2/3 et H3K27me2/3 vont réprimer la transcription. Les enzymes capables de réaliser ces modifications des histones (histones désacéthylases, histones méthyltransférase,…) appartiennent au complexe Polycomb.

L'empreinte parentale est un phénomène épigénétique affectant certains gènes et leur imposant une expression mono-allélique dépendante de l'origine parentale (paternelle ou maternelle). Il en résulte une non équivalence des génomes parentaux rendant le mode de reproduction sexuée obligatoire. Une soixantaine de gènes soumis à l'empreinte parentale ont été identifiés chez l'Homme mais on estime leur nombre entre 100 et 200. La plupart des

gènes soumis à empreinte parentale sont regroupés en grandes régions chromosomiques. L'empreinte est caractérisée par une méthylation (5mC au niveau des îlots CpG) différentiellement apposée sur les allèles parentaux au niveau d'éléments de contrôle appelés DMR (differentially methyled regions) et associée à une modification des histones.

Enfin, chez l'individu XX, une seule copie active du chromosome X étant suffisante, un des deux chromosomes est inactivé permettant une dose équivalente de X entre les mâles et les femelles. Le processus est régulé par plusieurs facteurs incluant des modifications d'histones tels que H3K9me2/3 et la région X inactivation center (XIC). La région XIC comprend plusieurs gènes codants ou non-codants. Le gène *X inactive specific transcript* (*XIST*) a été le premier gène non-codant découvert dans la région XIC. Ce gène est exclusivement exprimé dans la région XIC du chromosome inactivé et la mutation de son promoteur est associée à des anomalies familiales de l'inactivation du chromosome X (maladies graves comme le syndrome de Lowe) (Cau et al., 2006) et des cancers testiculaires (Looijenga et al., 1997).

Les CGP subissent, durant leur migration jusqu'à la colonisation des gonades, d'importants remaniements épigénétiques qui permettent l'effacement des marqueurs « somatiques », la réactivation du chromosome X chez la femelle et l'effacement de l'empreinte parentale permettant ensuite une reprogrammation épigénétique dépendante du sexe au cours de la gamétogénèse.

Dans un premier temps, il est décrit une perte de la diméthylation d'H3K9me2 dans les CGP à partir de 7,75 jpc chez la souris. Cette marque répressive est remplacée à partir de 8,25 jpc par une augmentation globale d'H3K27me3 (Hackett et al., 2012a). A partir de 8,5 jpc, BLIMP1 va former un complexe avec PRMT5, une arginine-méthyltransférase, pour diméthyler l'arginine en position 3 de l'Histone H4 (H4R3me2) (Ancelin et al., 2006). On observe également une déméthylation globale de l'ADN des CGP à partir de 8.0 jpc. La déméthylation de L'ADN se poursuit durant la migration des CGP et se termine quand elles ont colonisé les gonades autour de 12,5 jpc (pour revue Hackett et al., 2012b; Saitou et al., 2012). La déméthylation globale du génome et le remplacement d'H3K9me2 au profit d'autres modifications des histones comme H3K27me3 permet l'effacement de l'empreinte parentale, une réactivation transitoire du chromosome X dans les CG chez la femelle de 7,25 à 12,5 jpc et permettrait une régulation entre un état répressif et activateur de la transcription plus « plastique » des gènes spécifiques de la lignée germinale (Figure 4).

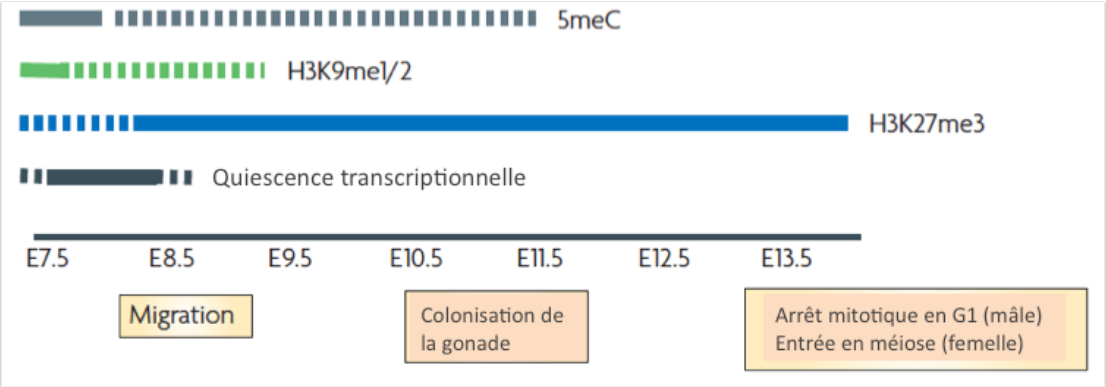


FIGURE 4 : Reprogrammation épigénétique, timing chez la souris
D'après Sasaki and Matsui, 2008.

La déméthylation du génome des CGP est suivie d'une reméthylation *de novo* des gènes soumis à empreinte selon un *timing* dépendant du sexe. Chez la femelle, la reprogrammation se fera en post-natal dans les ovocytes (donc méiose initiée) des follicules en croissance alors qu'elle aura lieu pendant la vie fœtale chez le mâle dans des cellules germinales qui n'auront pas initié la méiose. La réacquisition de l'empreinte parentale dans les cellules germinales a lieu dans des cellules présentant un état de différenciation différent chez le mâle et la femelle (pour revue Saitou et al., 2012). Cependant, il est intéressant de préciser que dans les deux cas, l'empreinte parentale est réapposée dans des cellules non proliférantes.

Chez l'Homme, les reprogrammations précoces du génome des CGP n'ont pas été étudiées à cause du manque de matériel d'étude disponible à ce stade de développement. Cependant, *PRMT5* est co-exprimé avec *BLIMP1* dans les cellules germinales (Eckert et al., 2008). L'étude de l'influence de l'état de méthylation de l'ADN d'une lignée cellulaire germinale humaine (TCam-2) a montré qu'une hypométhylation entrainait une surexpression des gènes de pluripotence *NANOG* et *OCT4* et du marqueur de cellule germinale *DDX4/VASA* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4/ VASA) (Wermann et al., 2010). La reprogrammation épigénétique du génome dans les CGP et les CG est nécessaire chez la souris pour l'expression du programme spécifique de cette lignée cellulaire. Ce mécanisme est très probablement conservé chez l'Homme.

En résumé de ce chapitre, les cellules germinales primordiales, précurseurs de la lignée germinale, émergent dès les premiers stades du développement embryonnaire au niveau de l'épiblaste. Elles vont ensuite migrer vers les gonades en formation. Au cours de cette migration les CGP vont se multiplier et subir d'intenses remaniements épigénétiques. Les cellules germinales qui en sont issues ont la particularité d'entrer en différenciation et de s'engager dans un destin germinal définitif tout en conservant un état pluripotent. Il a été proposé récemment qu'un certain nombre de gènes clés soient maintenus dans un état chromatinien compatible avec une activation rapide du génome tandis que des marques répressives sont observées sur une autre partie du génome (Lesch et al., 2013). Cette balance entre marques répressives et permissives serait caractéristique de la lignée germinale. Elle permettrait l'arrivée dans la gonade de cellules engagées dans une voie de différenciation germinale mais dotées d'une plasticité suffisante pour s'orienter vers une voie mâle ou femelle (résumé en figure 5).

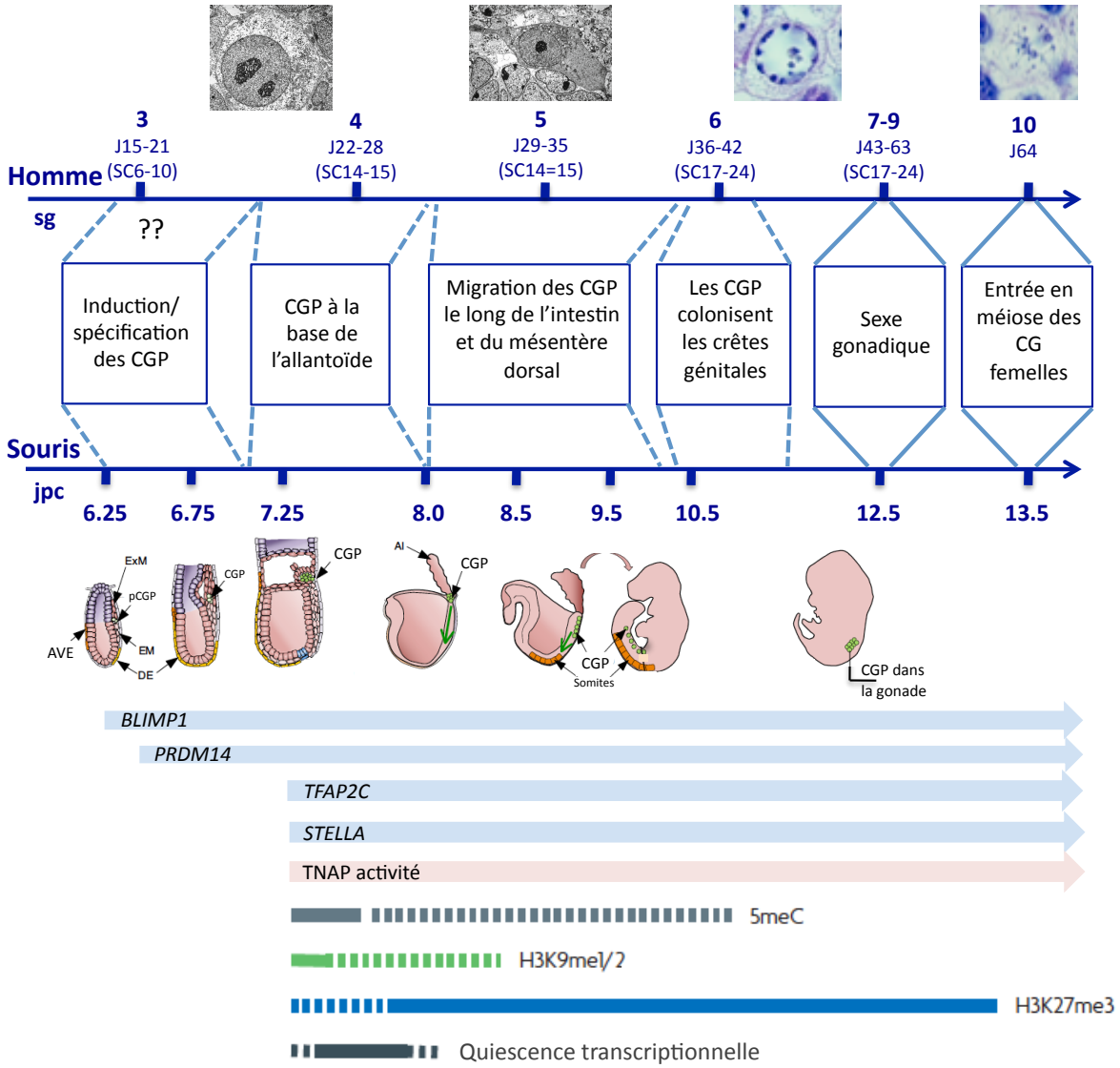


FIGURE 5 : Représentation schématique de la chronologie du développement des CGP chez la souris et l'Homme.

Les premières CGP se différencient au niveau de l'épiblaste proximal sous l'influence d'un signal BMP. En réponse à ce signal, les CGP induites activent les régulateurs de la transcription clés du destin germinal (BLIMP1, PRDM14, TFAP2C). Les CGP vont échapper au destin somatique et maintenir l'expression de gènes de pluripotence. Elles vont migrer le long de l'intestin et du mésentère jusqu'aux gonades indifférenciées tout en se multipliant. L'activité mitotique est particulièrement intense après la colonisation de la gonade. Chez la femelle, les CG entreront en méiose pendant la vie fœtale (Saitou et al., 2012; Leitch et al., 2013; De Felici, 2013).

3. Détermination sexuelle : « Highway to Venus »

Le premier évènement marquant de la détermination sexuelle est la différenciation des cellules somatiques en fonction du sexe chromosomique. Dans le cas d'une détermination sexuelle femelle, les cellules somatiques différenciées vont orchestrer l'engagement des cellules germinales vers la voie femelle pour former des ovocytes. L'ovaire va servir de support à la gamétogénèse et assurera une fonction endocrine nécessaire à l'acquisition du phénotype femelle, son rôle et sa différenciation sont donc essentiels pour la différenciation de la lignée germinale femelle. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur le développement de l'ovaire humain, sujet de cette thèse. Cependant, pour bien comprendre l'engagement vers la voie femelle et une partie de nos travaux, il est nécessaire d'exposer parallèlement la différenciation somatique testiculaire et le destin germinal mâle. Le modèle souris a fait l'objet de nombreuses études sur la détermination sexuelle et reste aujourd'hui le modèle de référence même si nous en exposerons les limites pour la transposition des mécanismes à l'Homme dans ce chapitre.

Un peu d'histoire pour commencer…

Les mécanismes de détermination du sexe chez l'Homme ont longtemps été la source de fascinations. De l'antiquité jusqu'au début du XX^{ème} siècle, l'unique théorie scientifique de détermination du sexe était basée sur un sexe lié à l'environnement (température et alimentation principalement). Hermann Henking décrit pour la première fois le chromosome X chez Pyrrhocoris (plus communément « gendarme »), en 1891. Il remarque qu'un chromosome qu'il nomme « élément X » se comporte différemment pendant la méiose. La redécouverte en 1900 de l'œuvre de Johann Gregor Mendel sur l'hérédité ainsi que la théorie chromosomique de l'hérédité de Walter Sutton et Theodor Boveri (1902) proposent que les chromosomes constitueraient les facteurs de l'hérédité mendélienne. Cette proposition est controversée jusqu'à la découverte du rôle du chromosome Y dans la détermination du sexe chez *Tenebrio Molitor* (plus communément « ver de farine »), indépendamment en 1905, par Nettie Stevens et Edmund Beecher Wilson. En 1915 les travaux de Thomas Hunt Morgan chez *Drosophilia melanogaster* en font la démonstration. De nos jours, il est établi que selon l'espèce, l'environnement et des facteurs chromosomiques interviennent dans la détermination du sexe en proportion plus ou moins importante.

Chez tous les vertébrés, les ovaires ou les testicules se développent à partir d'une ébauche gonadique bipotentielle. Cette ébauche gonadique va s'engager vers la voie mâle ou femelle en fonction de facteurs environnementaux comme la température (reptiles) ou l'environnement hormonal (poissons) ou en fonction du patrimoine génétique (mammifères, oiseaux). Chez les hyménoptères, le sexe dépend de l'état de ploïdie (deux copies du génome chez la femelle, une chez le mâle), chez la drosophile ou *Caenorhabditis elegans* du ratio nombre de chromosomes X/autosomes. Chez le mammifère, le sexe est déterminé chromosomiquement au moment de la fécondation en fonction du chromosome sexuel porté par le spermatozoïde. Le mâle est hétérogamétique (XY) et la femelle possède deux chromosomes sexuels identiques (XX). A leur formation en début de vie fœtale, les gonades sont bipotentielles. C'est la composition chromosomique des cellules somatiques de la gonade (XX ou XY) qui déterminera le sexe gonadique (détermination primaire du sexe). Chez le mâle XY, les gonades se différencient en testicules, chez la femelle XX, des ovaires se forment. De cette détermination gonadique découle une différenciation sexuelle secondaire des organes génitaux internes et externes et autres (cerveau entre autres) (Figure 6). Cette différenciation permet l'obtention du phénotype sexuel final et peut être la cible de perturbations. Toutes les espèces citées précédemment présentent des gonades sexuellement différenciées (ovaire ou testicule). Malgré des signaux initiateurs variables (chromosome Y chez le mammifère par exemple), ce constat laisse à penser que les grands mécanismes de différenciation sexuelle sont hautement conservés.

Les mécanismes de détermination du sexe ont été étudiés chez de nombreuses espèces. Chez la souris, l'invalidation spécifique de certains gènes a permis d'éclaircir les voies moléculaires de la différenciation sexuelle. Chez l'Homme, des patients porteurs de mutations géniques ou de remaniements chromosomiques présentant des anomalies du développement gonadique ont permis d'appréhender ces mécanismes.

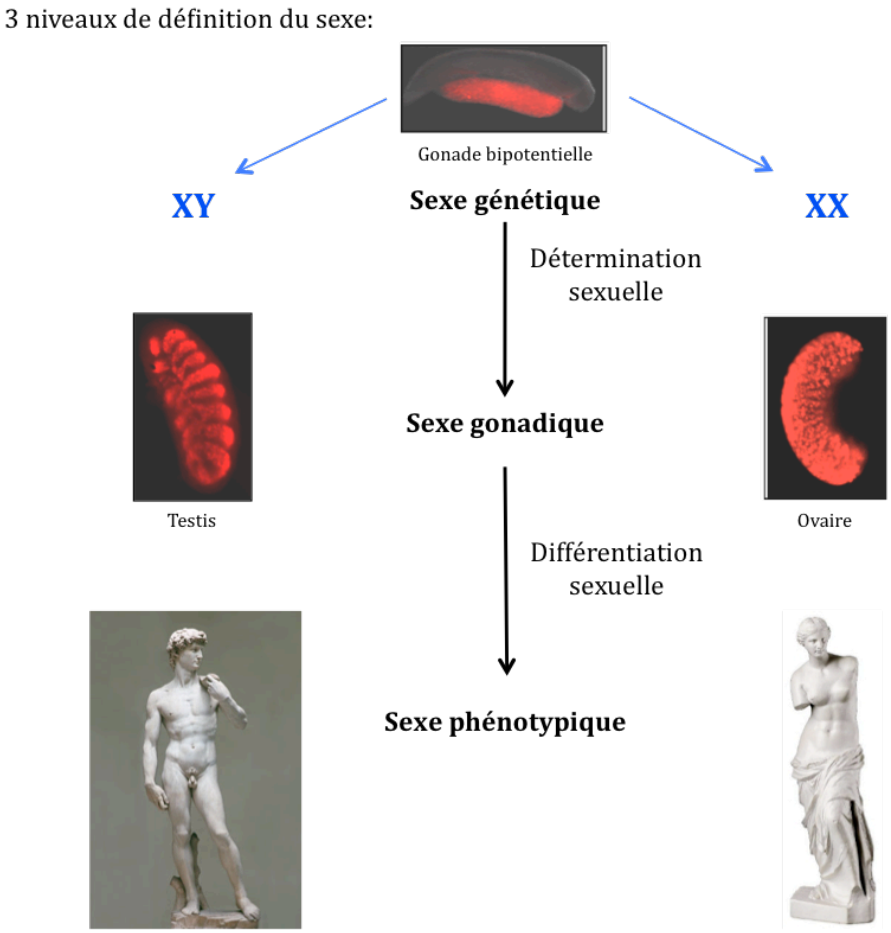


FIGURE 6 : Détermination sexuelle chez l'Homme
On distingue 3 niveaux pour définir le sexe d'un individu : le sexe chromosomique, le sexe gonadique et le sexe phénotypique.

3.1 Formation de la gonade indifférenciée

Chez les mammifères, les gonades se forment au sein de l'appareil urogénital en formation. Lors du développement embryonnaire, le mésoderme intermédiaire qui compose la majeure partie de la cavité cœlomique peut être segmenté en trois parties : le pronéphros (qui comprend les glandes surrénales primordiales), le mésonéphros (organe excréteur, futur rein chez le mammifère) et le métanéphros (partie la plus postérieure, support de la formation des reins). La crête génitale, ou gonade bipotentielle, se forme par un épaississement de l'épithélium cœlomique à la surface médio-ventrale du mésonéphros combiné à la migration de cellules du mésonéphros et à la colonisation des crêtes génitales par les CGP. Ce processus s'initie à 10.0 jpc chez la souris et aux alentours de la 4ème semaine de gestation chez

l'Homme (Georges and Wilson, 1994). A ce stade, l'ébauche gonadique est indifférenciée et composée de précurseurs cellulaires qui peuvent indépendamment suivre les deux voies de différenciation mâle et femelle. Il est décrit chez l'Homme, comme chez le macaque ou le porc, la formation de cordons sexuels primordiaux contigus au mésonéphros par pénétration de l'épithélium cœlomique au sein du mésenchyme (Fouquet and Dang, 1980; Pelliniemi and Lauteala, 1981; Francavilla et al., 1990; Satoh, 1991). Ces cordons de cellules épithéliales espacés par des cellules mésenchymateuses et unis entre eux au niveau du *rete* gonadique sont présents dès la formation de la gonade indifférenciée et indépendamment du sexe chromosomique de l'individu. Ils sont absents chez la souris, ce qui laisse supposer un développement de la gonade indifférenciée différent entre l'Homme et la souris que nous détaillerons après.

Les mécanismes moléculaires conduisant à la formation des crêtes génitales restent actuellement mal compris, même chez la souris. Cependant, le rôle fondamental de certains gènes comme Steroidogenic Factor 1 (*SF1*) et Wilms' Tumor 1 (*WT1*) a été décrit grâce à des patients présentant une dysgénésie gonadique (ensemble de symptômes présentant un défaut de développement des gonades) et par des études d'invalidation génique chez le rongeur.

SF1 (steroidogenic factor 1 ou Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 *NR5A1*) est un facteur de transcription à doigt de zinc qui semble jouer un rôle fondamental dans le maintien de la gonade juste après sa formation. Chez les souris *Sf1*$^{-/-}$, les crêtes génitales se forment jusqu'à 11,0-11,5 jpc mais dégénèrent rapidement (Luo et al., 1994). Chez l'Homme, l'expression de *SF1* a été mise en évidence dans la glande surrénale ainsi que dans la gonade indifférenciée dès 32-33 jpc (Ramayya et al., 1997; Hanley et al., 1999). La perte de *SF1* chez l'Homme a d'abord été associée à une insuffisance surrénalienne associée à une hypo-virilisation de degré variable. Des cas de dysgénésies gonadiques 46,XY isolées et d'insuffisance ovarienne prématurée chez la femme ont ensuite été décrits (Lakhal et al., 2012).

WT1 code pour un facteur de transcription à doigt de Zinc dont la mutation est décrite en cas de tumeurs du rein embryonnaire appelées tumeurs de Wilms (Haber et al., 1990). Chez la souris, en l'absence de *Wt1*, la gonade se forme mais dégénère rapidement à 11,5 jpc et les reins ne se forment pas (Kreidberg et al., 1993). La mutation de *WT1* chez l'Homme se traduit par une dysgénésie gonadique associée à des néphropathies (syndromes de Denys-Drash et de Frasier) (Veitia et al., 2001). Dans le cas du WAGR syndrome (tumeur de Wilms, aniridie,

anomalies uro-génitales et retard mental) la délétion d'une partie de la région 11p13 entraîne la perte de *WT1* et du gène *Paired box 6* (*PAX6*) (Le Caignec et al., 2007; Almind et al., 2009).

D'autres gènes impliqués dans l'établissement de la gonade bipotentielle ont été décrits. Chez la souris, l'invalidation du facteur de transcription à homeodomaine *Empty spiracles homeobox 2* (*Emx2*) entraîne un défaut de développement du mésonéphros et de l'épithélium cœlomique ainsi qu'une atteinte de développement du cerveau, une absence de reins, uretères et organes génitaux internes (Miyamoto et al., 1997). Chez l'Homme, il n'a été décrit pour le moment que des cas d'anomalie du développement du cortex cérébral (schizencéphalie) en cas de mutation du gène *EMX2* (Brunelli et al., 1996). Chez la souris, *LIM Homeobox 9* (*Lhx9*) agirait en amont de *Sf1* par trans-activation du promoteur de *Sf1*. On observe chez les souris *Lhx9*$^{-/-}$ une formation discrète de la gonade suivie d'un arrêt immédiat de la prolifération des cellules somatiques (Birk et al., 2000; Mazaud et al., 2002). Chez l'Homme, *LHX9* peut se lier directement au promoteur de *SF1* et pourrait également être impliqué dans la formation de la gonade. La Chromobox Homolog 2 (CBX2/M33), protéine M33 de la famille Polycomb, serait impliquée dans l'expression de *Sf1* chez la souris et son invalidation entraîne un retard de développement de la gonade (Katoh-Fukui et al., 1998; Katoh-Fukui et al., 2005). La mutation homozygote de *CBX2/M33* chez l'Homme entraîne une inversion sexuelle complète des individus XY (Biason-Lauber, 2010).

Plusieurs gènes ont été identifiés comme nécessaires à la formation de la gonade indifférenciée mais leur régulation et les mécanismes moléculaires sont encore mal décrits. Il existe de plus des différences significatives de l'impact de l'invalidation de ces gènes en fonction de l'espèce étudiée. Les anomalies de l'appareil génital et des autres organes conséquents à l'invalidation de ces gènes chez l'Homme et la souris sont résumées dans les Tableaux 1A et 1B.

A

Gène	Localisation	Type de protéine	Fonction	Type de mutation	Phénotype chez la souris		
					organes génitaux internes et externes		Autres organes
					40,XY	40,XX	40,XX/XY
Wt1	Chr2	Protéine à doigt de Zn	Facteur de transcription/ régulation de *SRY*	Perte de fonction	Absence de gonade et de tractus urogénital	Absence de gonade et de tractus urogénital	Absence de rein/ Anomalies de la rétine
Sf1/Nr5a1	Chr19	Récepteur nucléaire orphelin	Facteur de transcription	Perte de fonction	Absence de gonade	Absence de gonade	Absence de glande surrénale
Lhx9	Chr1	Protéine à homéodomaine	Facteur de transcription	Perte de fonction	Absence gonade/ canaux Müller +	Absence gonade	Anomalies du SN
Cbx2/M33	Chr11	Protéine du complexe Polycomb	Remodelage de la chromatine/ Repression de la transcription	Perte de fonction	Inversion sexuelle complète ou ambigüté sexuelle de degré variable. 100% stérilité	Hypoplasie gonadique, anomalies utérines. 100% stérilité	Non décrit
Emx2	Chr19	Protéine à homéodomaine	Facteur de transcription	Perte de fonction	Absence de gonade et de tractus urogénital	Absence de gonade et de tractus urogénital	Absence de rein et uretère/ Anomalies du SN

B

Gène	Localisation	Type de protéine	Fonction	Type de mutation	Phénotype chez l'Homme		
					organes génitaux internes et externes		Autres organes
					46,XY	46,XX	46,XX/XY
WT1	11p3	Protéine à doigt de Zn	Facteur de transcription/ régulation de *SRY*	Perte de fonction	Ambiguïté sexuelle ou organes génitaux externes feminins	Normal	Tumeur de Wilms
					Dysgénésie gonadique		Syndrome WARG
							Néphropathie (Denys-Drash/Frasier)
SF1/NR5A1	9q33	Récepteur nucléaire orphelin	Facteur de transcription	Perte de fonction	Dysgénésie testiculaire/absence	Ménopause précoce	Insuffisance surrenalienne
					Organes genitaux externes feminins, masculins ou ambigüs/ canaux Müller+		
LHX9	1q31-32	Protéine à homéodomaine	Facteur de transcription	Perte de fonction	Non décrit	Non décrit	Non décrit
CBX2/M33	17q25	Protéine du complexe Polycomb	Remodelage de la chromatine/ Repression de la transcription	Perte de fonction	Inversion sexuelle complète	Normal	Non décrit
EMX2	10q26.1	Protéine à homéodomaine	Facteur de transcription	Perte de fonction	Non décrit	Non décrit	Schizencéphalie

TABLEAUX 1A ET 1B : Principaux gènes impliqués dans le développement de la gonade indifférenciée

Tableaux récapitulatifs des principaux gènes décrits dans le développement de la gonade indifférenciée chez la souris (1A) et chez l'Homme (1B). Les deux tableaux présentent le gène, la localisation, et la fonction de la proteine et résument le phénotype observé au niveau des organes sexuels et des autres organes en fonction du type de mutation décrit (Biason-Lauber, 2010; Baxter and Vilain, 2013).

3.2 De la gonade indifférenciée à la gonade sexuellement différenciée

3.2.1. Ontogénèse chez l'Homme

Détermination primaire du sexe

La détermination du sexe de la gonade est la première étape de la différenciation sexuelle. Le sexe gonadique est déterminé par la constitution chromosomique des cellules somatiques de la gonade chez le mammifère.

Autour de 6 sg chez l'Homme, les cellules germinales primordiales (CGP) arrivent au niveau de l'ébauche gonadique et contribuent à la formation de la gonade (Motta and Makabe, 1982). L'organe est alors constitué de plusieurs types cellulaires : les cellules germinales (CG), les cellules du mésenchyme primitif et les cellules de l'épithélium cœlomique. A partir de la 8ème semaine de gestation, la constitution chromosomique des cellules somatiques va orienter directement ou indirectement le destin sexuel de la gonade et des CG. Les cellules somatiques des individus XY expriment le gène *Sex determining region of the Y* (*SRY*) qui initiera le programme de différenciation mâle, permettant le développement d'un testicule. Chez les individus XX, le gène *SRY* étant absent car porté par le gonosome Y, le programme de différenciation femelle va s'exprimer pour permettre le développement d'un ovaire. Les mécanismes moléculaires impliqués dans les deux voies seront détaillés plus loin.

Chez le mâle, anatomiquement, les cordons sexuels primitifs prolifèrent et s'étendent de la périphérie de la gonade vers la zone médullaire. Les CG sont incorporées à l'intérieur des cordons et vont suivre la voie de différenciation mâle. La différenciation des cellules somatiques des cordons testiculaires en cellules de Sertoli constitue le premier événement marquant du développement testiculaire (Wartenberg, 1978; Gondos et al., 1980). S'en suivent la différenciation des CG en spermatogonies et celle des cellules stromales en cellules péritubulaires et cellules de Leydig fœtales (Huhtaniemi and Pelliniemi, 1992) ainsi que la vascularisation/innervation du testicule. Une importante prolifération cellulaire est observée et le nombre de CG dépasse le million à 19 sg (Mamsen et al., 2011). Les cordons sexuels perdent leur contact avec l'épithélium de surface qui s'épaissit pour former l'albuginée. Les cordons de la partie distale sont plus minces et forment le *rete testis*. On observe une organisation en cordons sexuels contenant les CG et les cellules de Sertoli. Les cordons sont entourés d'une membrane basale et des cellules péritubulaires. Ces cordons sont situés dans

du tissu conjonctif interstitiel vascularisé et innervé dans lequel sont retrouvées les cellules de Leydig fœtales (Figure 7).

Anatomiquement, chez la femelle, les cordons sexuels primitifs dégénèrent mais les cellules épithéliales de surface produisent un nouvel ensemble de cordons qui ne pénètrent pas profondément dans le mésenchyme (médullaire) mais qui restent à la surface externe de l'organe (cortex) (Funkuda, 1976). Ces travées de cellules épithéliales entrelacées entourent les CG pour former les nids ovigères. Les CG se différencient en ovogonies reconnaissables par leur grande taille et leur grand noyau rond. Les CG prolifèrent rapidement par mitoses successives et forment des amas ou « cluster » de CG reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques suite à une cytodiérèse incomplète (Ruby et al., 1970). On estime à 5 millions le nombre de CG dans un ovaire à 5 mois de gestation (Mamsen et al., 2011). Vers la 10ème semaine de gestation, les premières CG initient la méiose et se différencient en ovocytes. On observe la coexistence d'ovogonies prolifératives et d'ovocytes à différents stades de la première division de méiose jusqu'à des âges fœtaux avancés (Kurilo, 1981). Vers 15 sg, les premiers follicules se forment au niveau de la partie interne du cortex, là où les ovocytes ont atteint le stade diplotène de méiose I en premier. Différentes lignées de cellules somatiques vont se différencier. Les cellules épithéliales (issues de l'épithélium cœlomique) se différencient en cellules de la pré-granulosa et s'assemblent étroitement autour des ovocytes. Dans un premier temps, une couche de cellules de la granulosa aplaties entoure un ovocyte pour former un follicule primordial, premier stade de la folliculogénèse (Hoang-Ngoc et al., 1989). De nombreuses jonctions cellulaires de type gap-junction se développent entre l'ovocyte et les cellules folliculaires qui l'entourent pour maintenir l'activité métabolique du complexe ovocyte-follicule (Dvorak and Tesarik, 1980). Une membrane basale entoure cet ensemble (membrane de Slavjanski). Pendant la vie fœtale, au cours de leur croissance en follicules primaires puis secondaires puis pré-antraux, les follicules vont s'entourer de cellules de la thèque (d'origine mésenchymateuse) qui se différencient à partir des cellules stromales (Figure 7).

Au cours du développement ovarien, de nombreuses cellules germinales, à différents stades de leur différentiation (en prolifération, en méiose et en diplotène inclus dans les follicules) commencent à dégénérer (Byskov, 1982). La dégénérescence de certains ovocytes est nécessaire à la formation des follicules primordiaux, elle peut également affecter les cellules

folliculaires et les follicules en croissance (Forabosco et al., 1991). Ce processus se nomme l'atrésie et l'équilibre entre prolifération/folliculogénèse et dégénérescence conditionne le bon déroulement du développement ovarien (Gondos, 1973). Il est décrit plusieurs mécanismes expliquant l'atrésie des ovocytes au cours du développement ovarien : l'apoptose, mécanisme le plus fréquemment observé, une phagocytose par les cellules de la granulosa et une élimination des ovocytes dans la cavité péritonéale *via* la surface de l'épithélium ovarien (Bonilla-Musoles et al., 1975). Les complexes ovocyte-follicule primordial resteront bloqués jusqu'à la croissance folliculaire et la reprise de la méiose au moment de l'ovulation 15 à 50 ans plus tard.

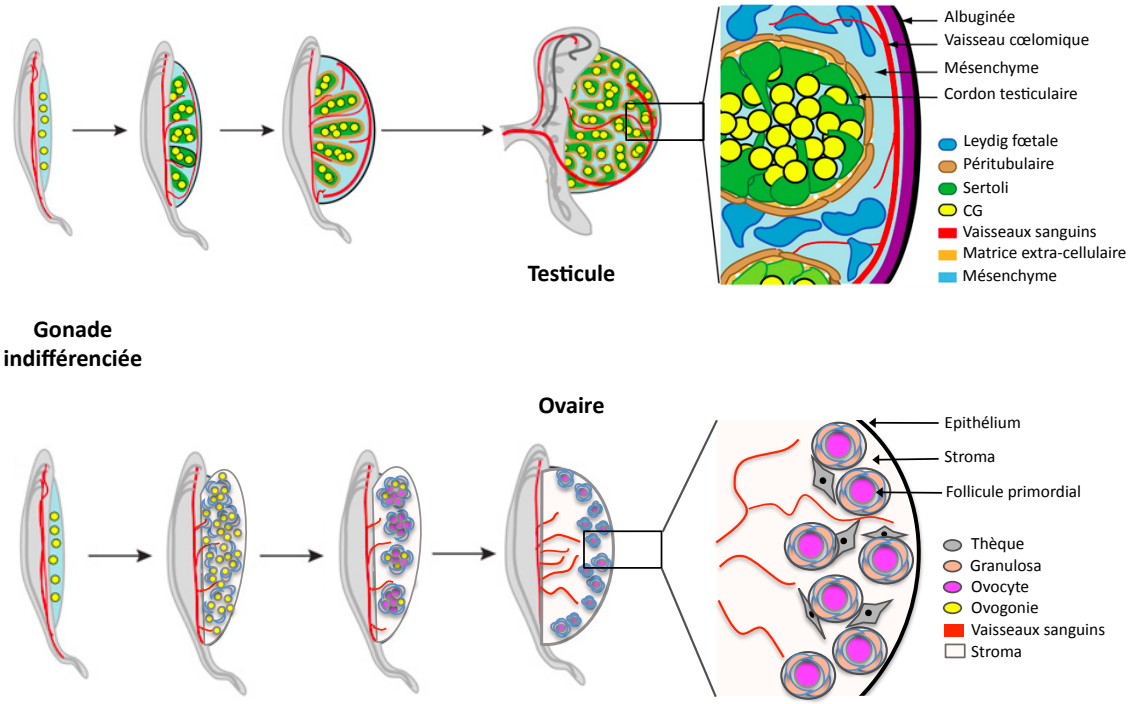


Figure 7 : Etapes de la différenciation gonadique en testicule ou ovaire
Schéma récapitulatif des étapes de la différenciation de gonade indifférenciée soit en testicule contenant des CG et des cellules de Sertoli enfermées dans des cordons séminifères et des cellules de Leydig dans le mésenchyme ; soit en ovaire contenant des ovocytes enfermés dans des follicules (Svingen and Koopman, 2013).

Les nombreuses études histologiques menées parallèlement chez la souris ont montré un développement plus rapide et synchrone de l'ovaire murin par rapport à celui décrit chez l'Homme. L'ovaire fœtal murin conserve globalement l'aspect inorganisé de la gonade indifférenciée, contrairement à la formation de cordons sexuels dans l'ovaire humain et de cordons séminifères visibles à 12.5 jpc chez la souris mâle XY. Dans la gonade murine XX, les CG restent dispersées puis l'ensemble de la population germinale entre en méiose à 13.5 jpc (Byskov, 1986). Cette initiation méiotique est dite « synchrone » et signe la différentiation ovarienne. Les CG parcourent la prophase de première division de méiose et se bloquent en diplotène selon un axe rostro-caudal entre 13,5 et 15,5 jpc. Peu de changements morphologiques sont observables jusqu'à la naissance (21 jpc). Il a été décrit des structures ressemblant à des nids ovigères à partir de 14 jpc (Ruby et al., 1969) dans lesquels les CG seraient adhérentes et synchronisées entre elles, et entourées par des cellules somatiques (Pepling and Spradling, 1998). La folliculogénèse s'initie en période périnatale, et non en période fœtale comme chez l'Homme. Le développement de l'ovaire fœtal murin (pour revue Ungewitter and Yao, 2013) diffère donc significativement de celui observé chez l'Homme. Le développement de l'ovaire humain est beaucoup plus long et asynchrone et l'on observe plusieurs populations de CG à différents stades de la différenciation dans un même tissu. Est-ce que la plus grande taille de l'organe humain et le nombre plus important de cellules germinales et somatiques impliquent une régulation et une diffusion des molécules différentes chez l'Homme expliqant l'asynchronie observée ? Ou bien est-ce que des mécanismes différents ou non conservés par rapport à ceux décrits chez la souris (et exposés dans les paragraphes suivants) interviennent chez l'Homme ? (Figure 8).

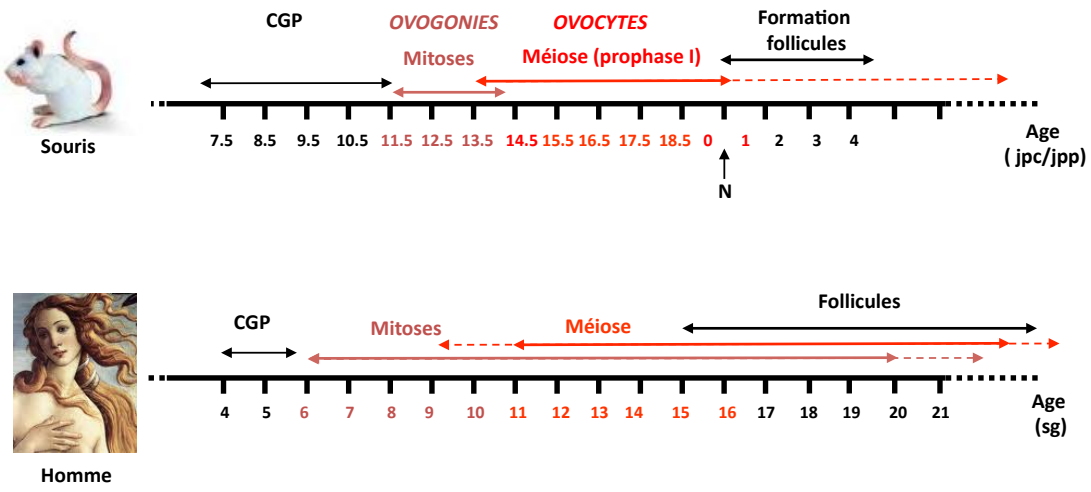


FIGURE 8 : Comparaison entre le développement ovarien murin et humain
Chez la souris, les CGP colonisent la gonade indifférenciée à 10,5 jpc. Après plusieurs divisions mitotiques, toutes les CG entrent en méiose à 13,5 jpc et parcourent la prophase I. Les ovocytes s'entourent de cellules folliculaires pour former des follicules après la naissance (N). Chez la femme, les CGP atteignent la gonade indifférenciée autour de 6 sg. Les CG prolifèrent par divisions mitotiques et les premières CG entrent en méiose vers 10-11 sg. Les premiers follicules se forment vers 17-20 sg. La différenciation des CG est asynchrone et l'on observe à un moment donné du développement des ovogonies en prolifération, des ovocytes à différents stades de la prophase I et des follicules en formation.

Détermination secondaire du sexe

Elle comporte la mise en place des organes génitaux internes et externes, des voies génitales et le développement des caractères sexuels secondaires (masculinisation du cerveau, pilosité, taille, développement du cartilage œsophagien, *etc*.). Cette détermination est sous le contrôle des hormones sécrétées par la gonade différenciée au cours du développement fœtal mais aussi post-natal et à l'âge adulte.

Chez l'individu XY, les cellules de Sertoli fœtales produisent l'Anti-Müllerian hormone (AMH) dès 6 sg. L'AMH induit la dégénérescence des canaux de Müller (issus d'une invagination de l'épithélium cœlomique de la région antérieure du mésonéphros) à partir de 8 sg. Les cellules de Leydig vont synthétiser des androgènes dont la testostérone dès la fin de la 6ème semaine de gestation, nécessaires au développement des canaux de Wolff (canaux mésonéphrotiques) et à leur différenciation en épididymes, canaux déférents et vésicules séminales. La testostérone est également nécessaire à la masculinisation des organes génitaux

externes. Les cellules de Leydig vont également sécréter l'insulin-like 3 (INSL3) qui en association avec la testostérone permet la descente des testicules dans le scrotum (Figure 9). A la naissance, chaque testicule contient des cellules de Leydig fœtales, des cordons séminifères sans lumière centrale contenant des CG et des cellules de Sertoli. A la puberté, l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire devient fonctionnel. Sous l'action des gonadotrophines sécrétées par l'hypophyse, les cellules de Leydig matures, appelées cellules de Leydig adultes, vont synthétiser les stéroïdes nécessaires au bon déroulement de la spermatogénèse et au maintien du phénotype mâle. Les CG initient la méiose pour produire des spermatozoïdes et les cordons testiculaires acquièrent une lumière centrale et prennent l'aspect de tubes séminifères. A l'âge adulte, le testicule a une fonction exocrine (spermatogénèse) et une fonction endocrine (stéroïdogénèse).

Chez la femelle, l'absence de sécrétion d'AMH et d'androgènes à 7 sg permet la différenciation des canaux de Müller qui donneront les oviductes, l'utérus, le col utérin et la partie supérieure du vagin et entraîne la régression des canaux de Wolff. En fin de vie fœtale, les cellules de la granulosa des follicules primaires à pré-antraux vont secréter de l'AMH et les cellules de la thèque vont secréter de la testostérone rapidement métabolisée en œstrogènes et progestérone par les cellules de la granulosa, sous l'action de l'aromatase (CYP19A1). Cette activité aromatase dans les petits follicules est atypique et spécifique de la période fœtale (Fowler et al., 2011). Ces hormones vont contribuer à la féminisation des voies génitales (Figure 9). La population de follicules primordiaux constituée pendant la vie fœtale représente un pool défini d'ovocytes disponibles ensuite pendant la vie reproductive de la femme adulte. A la naissance, le nombre de follicules primordiaux est estimé à 1-2 Millions. L'atrésie folliculaire continue pendant l'enfance et le nombre de follicules primordiaux restant au moment de la puberté est estimé à 400 000. A partir de ce moment, quelques follicules primordiaux entrent cycliquement en croissance. A chaque cycle menstruel, les follicules antraux sensibles aux gonadotrophines sont recrutés pour finir leur croissance mais un seul atteint le stade de follicule ovulatoire. L'ovocyte expulsé dans l'oviducte au moment de l'ovulation reprend la méiose en vue d'une éventuelle fécondation par un spermatozoïde. Le stock de follicules décroit et lorsque l'ovaire cesse de fonctionner, on parle de ménopause. On estime à 400-500 le nombre d'ovocytes qui seront ovulés et potentiellement fécondables durant la vie d'une femme sur les 1 Million présents à la naissance alors que des millions de spermatozoïdes sont produits continuellement chez l'homme à partir de la puberté.

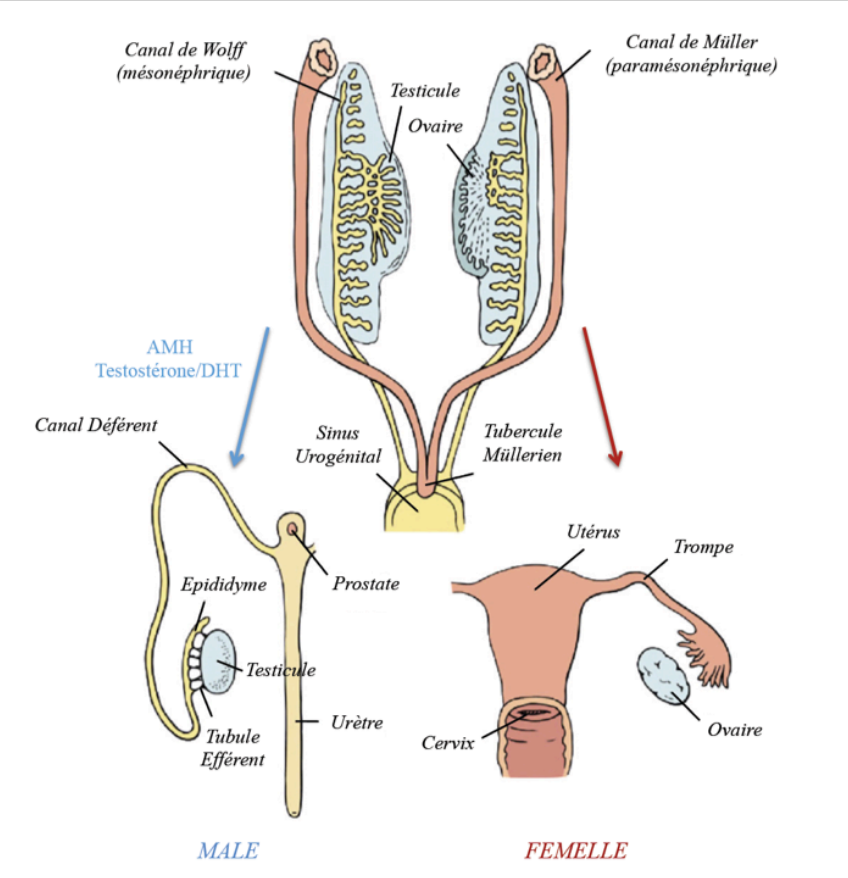


FIGURE 9 : Le développement des gonades et de leurs canaux chez les mammifères
D'après (Biason-Lauber, 2010; DeFalco and Capel, 2009).

Les mécanismes de détermination du sexe et de différenciation des cellules somatiques et germinales permettant l'organisation du testicule chez le mâle et de l'ovaire chez la femelle et aboutissant à un individu phénotypiquement stable mâle ou femelle à l'âge adulte vont être détaillés dans les paragraphes suivants. Pour améliorer la compréhension de ces mécanismes, nous les exposerons séquentiellement mais il est important de préciser que ces évènements sont concomitants et les mécanismes étroitement imbriqués.

3.2.2 Mécanismes de la détermination du sexe somatique

Le premier événement marquant du développement de la gonade est l'orientation des cellules somatiques gonadiques vers une voie de différenciation mâle ou femelle. Il sera suivi par la différenciation des CG vers la voie mâle ou femelle. Cette orientation des cellules germinales est étroitement dépendante de l'environnement somatique, c'est pourquoi nous avons jugé important d'en exposer les mécanismes.

3.2.2.1 Différenciation somatique testiculaire

Sex determining region of the Y, SRY

Après les travaux de Morgan en 1915 sur le rôle des chromosomes dans l'hérédité, il faut attendre la seconde moitié du XX^{ème} siècle pour que l'observation d'anomalies caryotypiques des chromosomes sexuels chez l'Homme (hommes XXY et femmes XO) fasse émerger l'idée d'une détermination sexuelle liée au chromosome Y (Ford et al., 1959b; Ford et al., 1959a; Jacobs and Strong, 1959). La région de détermination du sexe serait portée par le bras court du chromosome Y puisque des hommes porteurs d'un Y dépourvu de bras long ont un phénotype masculin alors que des individus porteurs du seul bras long du Y sont féminins. Fin 1987, David Page et col. proposaient une cartographie précise du locus TDF (Testis Determining Factor) sur le chromosome Y et l'isolement d'un gène candidat appelé par la suite *ZFY* (Page et al., 1987). Le travail conjoint des groupes de Peter Goodfellow et Marc Fellous concluent sur une localisation différente, plus distale (Palmer et al., 1989). En 1990, dans le même numéro de Nature, deux articles consécutifs des équipes de P. Goodfellow et Robin Lovell-Badge (Sinclair et al., 1990; Gubbay et al., 1990a) décrivent l'identification du gène *SRY* sur le bras court du chromosome Y. Les mutations de ce gène chez l'homme, ou la délétion de ce gène chez la souris induisent le développement femelle (Gubbay et al., 1990b) (Lovell-Badge and Robertson, 1990). Inversement, l'ajout de ce gène chez des souris transgéniques génétiquement femelles XX, induit une inversion sexuelle complète et le développement mâle (Koopman et al., 1991). *SRY* est donc nécessaire et suffisant à la différentiation mâle.

Localisé à 35kb de la région pseudo-autosomale sur le bras court du chromosome Y, *SRY* humain est un gène constitué d'un seul exon et codant pour une protéine de 223 acides aminés contenant un motif conservé, appelé boîte HMG (High Mobility Group). Ce domaine de liaison à l'ADN suggère que *SRY* pourrait être un facteur de transcription (Lovell-Badge, 1992). *SRY* est exprimé par les cellules somatiques dans les crêtes génitales des individus XY juste avant la formation des cordons séminifères, dès 10.5 jpc chez la souris (pic d'expression à 11.5 jpc) et dès le début de la 6ème semaine de gestation chez l'Homme (pic d'expression aux alentours du 44ème jpc). Son expression est maintenue chez l'Homme après la différenciation testiculaire jusqu'à l'âge adulte et la protéine SRY est retrouvée, entre autres, dans les CG chez l'Homme en période fœtale et postnatale (Salas-Cortes et al., 1999; Hanley et al., 2000). Ces données diffèrent de celles connues chez la souris où l'expression est réduite aux cellules somatiques et devient indétectable à partir de 12.5 jpc (pour revue Sekido and Lovell-Badge, 2009). Cette différence est retrouvée également chez la chèvre, modèle chez qui *Sry* est exprimé en vie fœtale dans la plupart des types cellulaires de la crête génitale et pas seulement dans les cellules de pré-Sertoli. A la puberté, *Sry* reste exprimé dans les cellules de Sertoli et les CG et à l'âge adulte, son expression diminue mais est maintenue à bas niveau dans certaines spermatogonies (Montazer-Torbati et al., 2010) (Figure 10 et tableaux 2A et 2B).

Cependant, seuls 10% des cas d'inversion sexuelle observés chez l'Homme et la souris sont associés à des mutations du gène *Sry*, laissant pressentir le rôle critique d'autres gènes dans la différenciation testiculaire (DiNapoli and Capel, 2008). Il a été établi chez la souris que le rôle de *Sry* est d'amorcer, dans la gonade indifférenciée, la cascade de différenciation sexuelle vers la voie mâle. *Sry* induit l'expression de *Sox9* (SRY-box 9) en se liant sur son promoteur. *Sox9* va permettre la différenciation des cellules de soutien en cellules de Sertoli, ce qui entraînera la différenciation testiculaire (Sekido and Lovell-Badge, 2008).

En micro-injectant des fragments d'ADN génomique contenant la séquence de *Sry* dans des ovocytes fécondés de souris, Koopman et col. ont permis de démontrer que *Sry* suffisait à induire un phénotype mâle chez des individus XX et que sa régulation ne dépendait pas de facteurs exclusivement masculins (Koopman et al., 1991). En effet, l'activation de *Sry* dépendrait de facteurs impliqués dans le développement de la gonade décrits précédemment. *Wt1*, *Sf1*, *Emx2* et *Cbx2* ont été proposés comme modulateurs de l'activation transcriptionnelle de *Sry* tout comme *Gata4* (*GATA bondong protein 4*) et son co-activateur

Fog2 (*Friend of GATA protein 2*) (de Santa Barbara et al., 2001; Tevosian et al., 2002; Pilon et al., 2003).

La localisation précise du facteur de détermination testiculaire (gène *SRY*) sur le chromosome Y a pris plus de 50 ans. D'autres gènes intervenant dans le développement du testicule ont par la suite été mis en évidence sur les autosomes. Il est établit également depuis 1950, grâce aux travaux d'Alferd Jost, que la différenciation sexuelle secondaire dépend de facteurs hormonaux et que le testicule fœtal est nécessaire au développement de l'appareil génital mâle.

Même si le développement testiculaire ne fait pas l'objet de cette thèse, nous en exposerons les grandes étapes dans ce manuscrit. Chez l'Homme, le développement testiculaire a été plus largement décrit que celui de l'ovaire et la compréhension des mécanismes impliqués permet de mieux appréhender la mise en place de la lignée germinale femelle (pour revue chez l'Homme Biason-Lauber, 2010; Ungewitter and Yao, 2013; Baxter and Vilain, 2013 ; et pour revue chez le rongeur Ungewitter and Yao, 2013; Svingen and Koopman, 2013) (Figure 10 et tableaux 2A et 2B).

Différenciation des cellules de Sertoli

L'expression transitoire de *Sry* dans les cellules somatiques va induire une intense prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique (Schmahl et al., 2000) et l'expression de *Sox9*, une autre protéine à boite HMG, va permettre à ces cellules de se différencier en cellules de Sertoli. Il s'ensuit une cascade d'activation de gènes et de signaux paracrines participant à la prolifération, la migration et la différenciation des cellules somatiques et germinales permettant la formation du testicule. Parallèlement à ces événements, la vascularisation du testicule se met en place.

Contrairement à *Sry* qui est spécifique des mammifères, l'expression de *Sox9* est très conservée chez les vertébrés. Comme *Sry*, *Sox9* est nécessaire et suffisant pour induire la différentiation testiculaire lorsqu'il est exprimé dans la gonade femelle (Vidal et al., 2001; Chaboissier et al., 2004). L'expression de *SOX9* débute entre 41 et 44 jpc chez l'Homme et à 10.5 jpc chez la souris sous l'influence de Sry. L'expression de *Sox9* est maintenue dans les

cellules de Sertoli pendant toute la vie fœtale et adulte grâce à plusieurs boucles d'amplification. Tout d'abord, SOX9 est capable de se lier à son propre promoteur pour activer sa propre transcription. Deux autres boucles de rétrocontrôle positif permettent le maintien de l'expression de *Sox9* : i) SOX9 active l'expression de la *Lipocalin-Prostaglandin D synthase* (*L-PtgdS*), enzyme permettant la conversion de la prostaglandine H2 (PGH2) en prostaglandine D2 (PGD2). En ce fixant sur son récepteur Prostaglandin D2 receptor (PTGDR), PGD2 va activer la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA) qui va induire la translocation nucléaire de SOX9. L'expression de *Ptgdr* et *Sox9* va ainsi être amplifiée (Malki et al., 2005) ; ii) sur un schéma identique, SOX9 active l'expression du *Fibroblast growth factor 9* (*Fgf9*) qui va activer l'expression de son propre récepteur *Fgfr2* (*Fibroblast growth factor receptor 2*) dont l'activation va également activer la transcription de *Sox9*. Ces boucles d'amplification de l'expression de *Sox9* diffusent par un mécanisme paracrine dans tout le testicule et verrouillent l'engagement dans la voie de différenciation mâle (Figure 10 et tableaux 2A et 2B). Cependant, de récentes études montrent que le premier rôle de *Fgf9* ne serait pas d'amplifier l'expression de *Sox9* mais de réprimer des gènes pro-ovariens décrits plus loin tels que *Wnt4* (Wingless-type MMTV integration site family, member 4) (Jameson et al., 2012). Chez la souris *Sox9*$^{-/-}$, on observe une absence de gonade et de tractus urogénital (Chaboissier et al., 2004) (Barrionuevo et al., 2006) et la mutation de *SOX9* chez l'Homme entraîne une dysgénésie testiculaire. *SRY* est donc nécessaire pour « enclencher le programme mâle » mais *SOX9* prend rapidement le relais et est nécessaire au bon déroulement de ce programme et à la différenciation mâle. *Sf1* a été proposé pour initier, chez la souris, l'expression de *Sox9* indépendamment de *Sry* car l'expression de *Sox9* est supprimée très précocement chez les mutants *Sf1*$^{-/-}$ (Sekido et al., 2004). Cependant, le tableau moins franc observé chez des patients mutés pour *SOX9* laisse à penser que *SOX9* n'est pas suffisant chez l'Homme ou qu'il existe des redondances.

A

Gène	Localisation	Type de protéine	Fonction	Type de mutation	Phénotype chez la souris		
					organes génitaux internes et externes		Autres organes
					40,XY	40,XX	40,XX/XY
Sry	Chr Y	Protéine à boite HMG	Facteur de détermination mâle	Perte de fonction	Dysgénésie testiculaire Canaux de Müller+	Non applicable	Normal
				Translocation	Non décrit	Inversion sexuelle complète	Normal
Sox9	Chr11	Protéine à boite HMG	Facteur de transcription	Perte de fonction	Absence de gonade et de tractus urogénital	Absence de gonade et de tractus urogénital	Absence de rein et uretère/ Anomalies du SN
				Duplication	Non décrit	Non décrit	Non décrit
Sf1/Nr5a1	Chr19	Récepteur nucléaire orphelin	Facteur de transcription	Perte de fonction	Absence de gonade	Absence de gonade	Absence de glande surrénale
Dmrt1	Chr19	Protéine à domaine DM de liaison à l'AND	Facteur de transcription	Perte de fonction	Involution testiculaire et ré-organisation en ovaire-like à la naissance	Normal	Non décrit
Dhh	Chr15	Molecule de signalisation	Morphogénèse	Perte de fonction	Altération de la spermatogénèse	Non décrit	Normal
Gata4	Chr14	Protéine à 2 domaines en doigt de Zn	Facteur de transcription	Perte de fonction	Normal	Dysgénésie ovarienne	Anomalies cardiaques

B

Gène	Localisation	Type de protéine	Fonction	Type de mutation	Phénotype chez l'Homme		
					organes génitaux internes et externes		Autres organes
					46,XY	46,XX	46,XX/XY
SRY	Yp11.3	Protéine à boite HMG	Facteur de détermination mâle	Perte de fonction	Dysgénésie testiculaire/absence Organes genitaux externes feminins ou ambigüs/ canaux Müller+	Non applicable	Normal
				Translocation	Non décrit	Testis ou ovotestis Organes génitaux ext mâles ou ambigüs	Normal
SOX9	17q24.3-q25.1	Protéine à boite HMG	Facteur de transcription	Perte de fonction	Dysgénésie testiculaire Canaux Müller +/-	Normal	Dysplasie camptomélique
				Duplication	Non décrit	Reversion sexuelle	Non décrit
SF1/NR5A1	9q33	Récepteur nucléaire orphelin	Facteur de transcription	Perte de fonction	Dysgénésie testiculaire/absence Organes genitaux externes feminins ou ambigüs/ canaux Müller+	Ménopause précoce	Insuffisance surrenalienne
DMRT1	9q24.3	Protéine à domaine DM de liaison à l'AND	Facteur de transcription	Perte de fonction	Dysgénésie testiculaire Organes génitaux externes femelles ou ambigüs/ canaux de Müller+	Normal	Retard mental, microcéphalie, anomalies de la face
DHH	12q13.1	Molecule de signalisation	Morphogénèse	Perte de fonction	Dysgénésie testiculaire Ambiguïté génitale	Normal	polyneuropathies
GATA4	8p23.1-p22	Protéine à 2 domaines en doigt de Zn	Facteur de transcription	Perte de fonction	Ambiguïté génitale	Normal	Déficience cardiaque congénitale

TABLEAUX 2A ET 2B : Principaux gènes impliqués dans la différenciation testiculaire
Tableaux récapitulatifs des principaux gènes décrits dans la différenciation testiculaire chez la souris (2A) et chez l'Homme (2B). Les deux tableaux présentent le gène, la localisation, et la fonction de la proteine et résument le phénotype observé au niveau des organes sexuels et des autres organes en fonction du type de mutation décrit (Biason-Lauber, 2010; Baxter and Vilain, 2013).

L'AMH appartient à la super-famille du TGFβ qui rassemble de nombreux facteurs agissant sur la croissance et la différenciation cellulaire. Elle est également connue sous le nom de Müllerian inhibiting substance (MIS) ou factor (MIF) et est très conservée. Son existence fut suggérée dans les années 1940 par Alfred Jost mais il faudra attendre 1973 pour détecter son activité dans les cellules de Sertoli immature (Josso, 1973). L'AMH a initialement été décrite pour son rôle dans la régression des canaux de Müller chez le mâle que nous décrirons dans le paragraphe suivant. Cependant, certains éléments laissent à penser que l'AMH pourrait avoir un rôle plus précoce dans la détermination du sexe. En effet, SOX9 peut se lier directement à un élément de réponse spécifique dans le promoteur de l'*Amh* (Morais da Silva et al., 1996). Chez la souris, l'expression de l'*Amh* est précédée d'un pic d'expression de *Sox9* (Figure 10). Alors que chez poulet et le reptile, l'*Amh* est le premier facteur testiculaire détecté et SOX9 n'est pas nécessaire à la transcription de l'*Amh* (Oreal et al., 1998; Western et al., 1999). L'expression de l'*AMH* est précoce chez l'Homme, dès 6 sg (Taguchi et al., 1984) ce qui coïnciderait avec un rôle potentiel dans la détermination du sexe.

Les gènes contenant un domaine DM de liaison à l'ADN (domaine à doigt de zinc atypique) régulent la détermination du sexe et la différenciation sexuelle chez la plupart des espèces de métazoaires incluant les nématodes, les insectes et les vertébrés. Chez ces derniers, plusieurs gènes à domaine DM – membres de la famille des *DMRT* (*doublesex and mab-3-related transcription factors*) – jouent un rôle dans la différentiation gonadique et la gamétogénèse. *Dmrt1*, notamment, est exprimé dans les cellules somatiques et germinales de la gonade indifférenciée dès 10,5 jpc chez la souris. Chez le mâle, l'expression de *Dmrt1* devient plus soutenue dans les cellules de Sertoli que dans les CG à partir de 12,5 jpc (Lei et al., 2007). La perte de *Dmrt1* chez la souris mâle ne semble pas avoir de conséquence sur la lignée sertolienne avant la naissance (Kim et al., 2007a) mais impacte sévèrement le maintien de cette lignée au cours de la vie post-natal (Raymond et al., 2000; Matson et al., 2011). Sans *Dmrt1*, les cellules de Sertoli ne peuvent pas se différentier complètement et expriment des marqueurs de cellules femelles de la pré-granulosa comme *Foxl2* ou l'aromatase (*Cyp19a1*) que nous décrirons plus loin. On observe une re-programmation des cellules de Sertoli en cellules de la « pré-granulosa-like » (voie femelle), l'apparition de cellules assimilées à des cellules de la thèque et une ré-organisation de la gonade proche d'une structure ovairienne (Zarkower, 2013). *Dmrt1* semble nécessaire au maintien de la différentiation mâle *via* le maintien de la lignée Sertolienne. Chez l'Homme, la perte de *DMRT1* entraîne une dysgénésie testiculaire pouvant aller jusqu'à la formation d'ovotestis (Ounap et al., 2004; Ledig et al.,

2012; Lopes et al., 2013). Bien qu'il existe des différences fondamentales entre le développement de la gonade murine et humaine, la formation d'ovotestis en cas de mutation de *DMRT1* chez l'Homme suggère un potentiel rôle plus précoce dans la différenciation sexuelle chez l'Homme (Figure 10 et tableaux 2A et 2B).

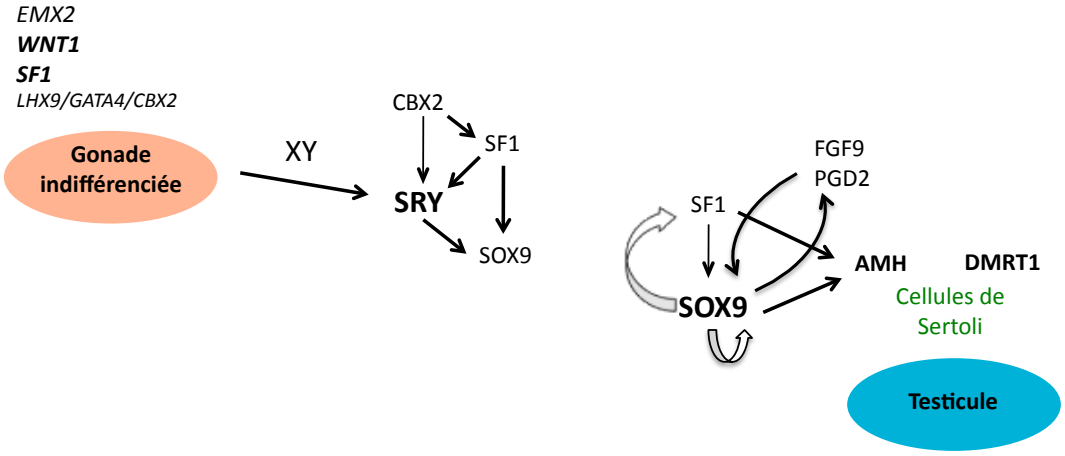


FIGURE 10: Contrôle génétique de la détermination du sexe masculin chez la souris

Formation des cordons

La formation des cordons testiculaires (futurs tubes séminifères) est l'événement définissant anatomiquement la différenciation testiculaire. Ces cordons permettent de séparer les deux fonctions du testicule, c'est à dire la spermatogénèse (à l'intérieur des tubes séminifères à l'âge adulte) et la production d'androgènes (espace interstitiel). Ils permettent de prévenir l'entrée en méiose des CG dans le testicule fœtal et permettront à l'âge adulte la production des gamètes matures.

Rapidement après l'activation de *Sox9*, des cellules somatiques vont se différencier en cellules de Sertoli, première étape de la différenciation. Elles s'agrègent autour d'amas de CG pour former des cordons qui emprisonnent les CG. Les cellules de Sertoli vont ensuite orchestrer la différenciation mâle, l'organisation de la gonade en testicule et le maintien du phénotype mâle. Par l'expression de *Desert hedghog* (*DHH*), elles induisent la différenciation de certaines cellules d'origine mésonéphritique en cellules péritubulaires reconnaissables à 13,5 jpc chez la souris (Jeanes et al., 2005) et à 12 sg chez l'Homme (Ostrer et al., 2007) qui vont s'assembler autour des cordons testiculaires. L'expression de DHH va induire la

différenciation d'un autre type de cellules somatiques décrit ensuite : les cellules de Leydig fœtales (Yao et al., 2002). Le facteur paracrine sertolien *Dhh* agirait en gradient de concentration induisant la différenciation des cellules les plus proches des Sertoli en cellules péritubulaires et les cellules les plus lointaines en cellules de Leydig fœtales.

Les cellules de Sertoli vont également induire la production d'AMH dès la fin de la 6ème semaine de gestation chez l'Homme *via SOX9* (Rajpert-De Meyts et al., 1999). *SF1*, gène décrit précédemment dans la formation de la gonade indifférenciée, active également l'expression de l'*AMH*. La régression des canaux de Müller induite par l'AMH chez le mâle est complète à 9 sg (Taguchi et al., 1984). L'expression d'AMH sera retrouvée chez le mâle jusqu'à la puberté. Elle constitue un bon marqueur des cellules de Sertoli fœtales et post-natales.

Différenciation des cellules de Leydig

Les cellules de Leydig produisent les hormones stéroïdiennes qui vont induire et maintenir les caractères sexuels secondaires. Chez le mammifère, les cellules de Leydig émergent en deux vagues pour former une lignée de cellules de Leydig fœtales et une lignée de cellules de Leydig adultes dont les origines font débat. L'émergence *via* des lignées cellulaires distinctes ou la présence d'un précurseur commun aux deux lignées fait également débat (pour revue Wainwright and Wilhelm, 2010; Svingen and Koopman, 2013). Il est admis aujourd'hui que des cellules cœlomiques migrent dans la gonade et se différencient, au sein du tissu interstitiel, en cellules de Leydig fœtales sous l'induction du morphogène *DHH* secrété par les cellules de Sertoli (Yao et al., 2002) (Tableaux 2A et 2B).

Dès la fin de la 6ème semaine de gestation chez l'Homme et 12,5 jpc chez la souris, les cellules de Leydig vont sécréter des androgènes, notamment la testostérone, nécessaires à la différenciation secondaire et au maintien de la masculinisation du fœtus. La testostérone va permettre le développement des canaux de Wolff, le développement des organes génitaux externes, la masculinisation du cerveau ainsi que la descente des testicules (action combinée avec l'Insulin-like 3 (INSL3) également sécrétée par les cellules de Leydig). L'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) en vie fœtale et la LH à l'âge adulte vont stimuler la synthèse des androgènes par les cellules de Leydig *via* l'expression de *SF1* qui régule la transcription des enzymes de la stéroïdogénèse (Morohashi et al., 1993; Leers-Sucheta et al.,

1997). En plus de leur rôle endocrine, les cellules de Leydig fœtales ont un rôle paracrine. Elles vont produire l'Activine A, membre de la famille du TGFß, qui va agir sur les cellules de Sertoli pour activer leur prolifération. En l'absence d'Activine A, on observe une absence d'élongation et d'expansion des cordons testiculaires due à une diminution de la prolifération sertolienne (Archambeault and Yao, 2010).

En résumé, l'expression transitoire de *Sry* chez le mâle va induire l'expression de *Sox9*. Il s'ensuit une cascade d'activation de gènes permettant la différenciation mâle et le maintien de cette différenciation. Les cellules de Sertoli vont se différencier et orchestrer la différenciation des autres types cellulaires et l'organisation de la gonade en testicule (Figure 11). Les cellules de Leydig fœtales présentes dans le tissu interstitiel vont secréter les hormones nécessaires à la masculinisation des autres organes de l'individu et à l'acquisition des caractères sexuels secondaires mais aussi participer à la formation des cordons testiculaires. Des voies de signalisations paracrines entre les différents types cellulaires vont être nécessaires à l'organisation du testicule et au maintien du phénotype mâle.

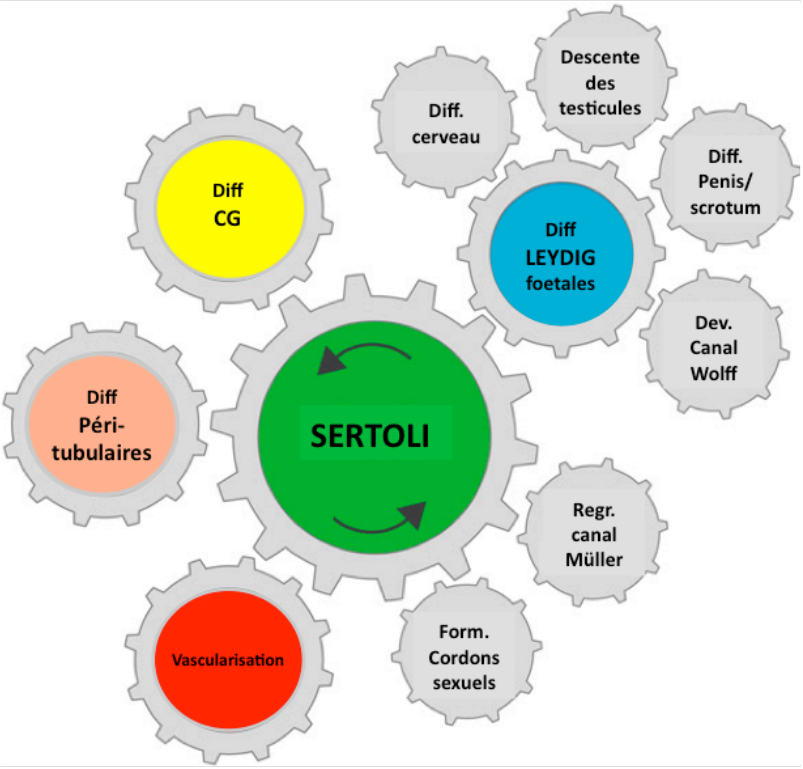


FIGURE 11 : Rôle central des cellules de Sertoli dans la différenciation testiculaire
Les cellules de Sertoli vont orchestrer la vascularisation testiculaire, la différenciation des cellules péritubulaires la différenciation sexuelle des CG et des cellules de Leydig. De la différenciation des cellules de Leydig va découler l'acquisition des caractères sexuels secondaires (Svingen and Koopman, 2013).

3.2.2.2 Différenciation somatique ovarienne

La théorie d'un développement ovarien « par défaut » en l'absence du facteur testiculaire SRY a longtemps été considérée comme un dogme. Cependant, certaines anomalies du déterminisme du sexe chez des patientes ne pouvant s'expliquer du seul fait de SRY, l'hypothèse d'un facteur Z induisant la différenciation ovarienne et inhibant la voie testiculaire a été avancée. A l'heure actuelle, il est clairement admis que l'orientation de la gonade vers un destin femelle ou mâle résulte d'un subtil équilibre entre des facteurs pro-ovariens ou pro-testiculaires (pour revue Kim and Capel, 2006; Biason-Lauber, 2010; Ungewitter and Yao, 2013). De récentes études montrent qu'il existe des facteurs ovariens en l'absence desquels la différenciation ovarienne est impossible. A l'identique des cellules de Sertoli dans le testicule, c'est la différenciation des cellules somatiques en précurseurs de cellules de la granulosa qui rythme la différenciation et l'organisation de la gonade en ovaire. Cependant, le dialogue entre les CG et les cellules somatiques semble plus critique chez la femelle que chez le mâle quelque soit le stade de développement. Les interactions entre les deux lignées cellulaires sont primordiales dans la mise en place de l'ovaire et son fonctionnement.

Un facteur du déterminisme ovarien ?

DAX1 (Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) a longtemps été proposé comme l'homologue ovarien de *SRY* (facteur Z) car ce gène est porté par le chromosome X, et par conséquent la femelle en porte deux copies. Il est exprimé dans les cellules somatiques dès le stade de gonade indifférenciée. Chez l'Homme, la duplication de *DAX1* chez un individu XY entraîne une inversion sexuelle complète mâle vers femelle (Sanlaville et al., 2004). Cependant, l'étude chez la souris a montré que les souris $Dax1^{-/-}$ ont un développement ovarien normal (Yu et al., 1998) (Tableaux 3A et 3B). De plus, la réactivation du chromosome X supplémentaire chez la femelle (décrit précédemment) n'a pas lieu dans les cellules somatiques ce qui va à l'encontre de l'existence d'un déterminant somatique femelle porté par le gonosome X. Il a finalement été montré que *Dax1* n'induisait pas un programme somatique ovarien mais réprimait le programme testiculaire en diminuant l'expression de *Sox9* (Ludbrook et al., 2012). Même si un déterminant chromosomique (qui serait lié à la présence de 2 copies du chromosome X) de

la voie femelle équivalent de SRY n'a pas été trouvé à ce jour, de récentes études proposent des modèles de différenciation et de maintien de la voie femelle que nous allons détailler.

A

Gène	Localisation	Type de protéine	Fonction	Type de mutation	Phénotype chez la souris		
					organes génitaux internes et externes		Autres organes
					40,XY	40,XX	40,XX/XY
Dax1	ChrX	Recepteur nucléaire	Facteur de transcription	Duplication	Retard developpement testiculaire mais fonction normale	Normal	
				Perte de fonction	Normal	Normal	hypogonadisme hypogonadotrope
Rspo1	Chr4	Protéine de signalisation	Stabilisation β-Cat	Perte de fonction	Normal	Ovotestis Müller -	
Wnt4	Chr4	Protéine de signalisation	Stabilisation β-Cat	Perte de fonction	Non décrit	Ovotestis Müller -	Agénésie rénale
				Duplication	Anomalie de la vascularisation du testicule, développement anormal	Non décrit	Non décrit
Foxl2	Chr9	Domaine de liaison à l'AND Fork-head	Facteur de transcription	Perte de fonction	Normal	Stérilité	Anomalies cranio-faciales Absence de paupière supérieure

B

Gène	Localisation	Type de protéine	Fonction	Type de mutation	Phénotype chez l'Homme		
					organes génitaux internes et externes		Autres organes
					46,XY	46,XX	46,XX/XY
DAX1	Xp21.3	Recepteur nucléaire	Facteur de transcription	Duplication	Dysgénésie testiculaire à inversion sexuelle	Normal	Retard mental
				Perte de fonction	Normal	Normal Retard puberté	hypogonadisme hypogonadotrope
RSPO1	1p34.2	Protéine de signalisation	Stabilisation β-CAT	Perte de fonction	Normal	Müller -	Carcinome cutané
						Ambiguité sexuelle	Hyperkeratose palmo-plantaire
WNT4	1p35	Protéine de signalisation	Stabilisation β-CAT	Perte de fonction	Non décrit	Hypergonadisme ovotestis à inversion sexuelle totale Muller +/- syndrome SERKAL	Dysgénésies rénale, pulmonaire et surrénalienne. Anomalies cardiaques
				Duplication	Ambiguïté génitale hypospadias Müller et Wolff +		RCIU Tetralogie de Fallot Retard mental
FOXL2	3q23	domaine de liaison à l'AND Fork-head	Facteur de transcription	Perte de fonction	Normal	Menopause précoce	BPES

TABLEAUX 3A ET 3B : Principaux gènes impliqués dans la différenciation ovarienne
Tableaux récapitulatifs des principaux gènes décrits dans la différenciation ovarienne chez la souris (3A) et chez l'Homme (3B). Les deux tableaux présentent le gène, la localisation, et la fonction de la proteine et résument le phénotype observé au niveau des organes sexuels et des autres organes en fonction du type de mutation décrit (Biason-Lauber, 2010; Baxter and Vilain, 2013).

Mécanismes moléculaires de la différenciation des cellules somatiques femelles

La voie « canonique » de signalisation de la famille des *WNT* est essentielle au cours du développement et contrôle la différenciation de progéniteurs de nombreuses lignées cellulaires et la morphogénèse (pour revue Nelson and Nusse, 2004). La fixation des protéines WNT à leurs récepteurs, présents à la surface cellulaire, va empêcher la destruction de la Catenin (cadherin-associated protein), beta 1 également appelée ß-caténine (CTNNB1/ ß-CAT). La stabilisation de ß-CAT permet sa translocation dans le noyau et l'activation de la transcription de nombreux gènes. Dans les gonades, l'activation de cette voie de signalisation est majoritairement exprimée dans l'ovaire et parmi les différentes protéines WNT, WNT4 joue un rôle particulièrement important. Chez la souris, *Wnt4* est exprimé dans la gonade indifférenciée. A partir de 11,5 jpc, *Wnt4* est surexprimé dans l'ovaire et s'éteint dans le testicule (Parma et al., 2006). Chez le mutant murin *Wnt4*$^{-/-}$, on observe une inversion sexuelle femelle vers mâle partielle avec une gonade contenant à la fois des structures semblables à des cordons testiculaires et des cellules stéroïdogènes (assimilées à des cellules de Leydig) et des structures ovariennes contenant des ovocytes (Vainio et al., 1999; Heikkila et al., 2005). Chez l'Homme, la mutation homozygote de *WNT4* chez des individus XX provoque l'apparition du syndrome SERKAL (SEx Reversion, Kidneys, Adrenal and Lung dysgenesis) qui se traduit entre autres, par une inversion sexuelle femelle/mâle caractérisée par une ambiguïté de l'appareil génital externe et un développement de la gonade allant de l'ovotestis au testicule normalement développé (Mandel et al., 2008). Ces données montrent que le rôle de WNT4 semble relativement conservé chez les mammifères et en font un acteur important du déterminisme ovarien. Cependant, la surexpression de *Wnt4* chez la souris XY n'est pas suffisante pour l'obtention d'un ovaire fonctionnel même si elle altère sévèrement le développement testiculaire (Correa et al., 2012). De même chez l'Homme, un cas de surexpression de *WNT4*, induite par une duplication du bras court du chromosome 1 portant ce gène, a été décrite chez un patient 46XY présentant une ambiguïté de l'appareil génital, un hypospadias prononcé ainsi que la persistance des canaux de Müller et de Wolff mais sans inversion sexuelle complète (Jordan et al., 2001). *WNT4* semble donc nécessaire mais non suffisant au développement ovarien (Figure 12 et tableaux 3A et 3B).

Un autre activateur de la voie ß-CAT, *RSPO1* (*R-spondin 1*), est exprimé dans la gonade indifférenciée par les cellules somatiques et devient spécifique de l'ovaire après la détermination somatique (Chassot et al., 2008). La mutation de RSPO1 a été identifiée chez des patients 46,XX présentant une ambiguïté sexuelle (*SRY* négative) et une hyperkératose

palmo-plantaire (Parma et al., 2006). Dans le modèle murin, il a été montré que *Rspo1* stimulait l'expression de *Wnt4* et que *Rspo1* et *Wnt4* agissaient de manière synergique pour stabiliser ß-CAT (Chassot et al., 2008). La translocation nucléaire de ß-CAT permet l'activation de l'expression de gènes permettant la différenciation des cellules de la granulosa et les souris XX *Rspo1*$^{-/-}$ présentent une inversion sexuelle partielle avec la présence d'ovotestis. L'analyse de l'expression de *Rspo1* chez les souris *Wnt4*$^{-/-}$ et de Wnt4 chez les souris *Rspo1*$^{-/-}$ indique que Rspo1 agit en amont de Wnt4 pour renforcer son expression et son action (Chassot et al., 2008; Tomizuka et al., 2008). Cependant, les souris *Rspo1*$^{-/-}$; *Wnt4*$^{-/-}$ présentent un développement ovarien normal dans un premier temps mais acquièrent des caractéristiques testiculaires comme la présence de cellules proches des cellules de Sertoli et de cordons testiculaires juste après la naissance (Chassot et al., 2008; Tomizuka et al., 2008). Ces facteurs sont donc nécessaires au développement ovarien mais, également, non suffisants (Figure 12 et tableaux 3A et 3B).

Un autre facteur essentiel à la différenciation des cellules de la granulosa est le facteur de transcription *FOXL2* (Forkhead box L2). Chez la souris *Foxl2* est un facteur somatique de différenciation ovarienne précoce spécifiquement exprimé dans les cellules de la pré-granulosa à 12.0 jpc (Schmidt et al., 2004; Ottolenghi et al., 2007; Auguste et al., 2011). Son expression n'est pas retrouvée dans la gonade indifférenciée ni chez les individus XY. Chez la souris, les femelles *Foxl2*$^{-/-}$ présentent des anomalies cranio-faciales, une absence de paupière supérieure et un arrêt de la maturation folliculaire aux stades primordial/primaire entrainant une dégénérescence folliculaire responsable d'une stérilité (Schmidt et al., 2004). Dans des travaux plus récents, *Foxl2* a été invalidé conditionnellement en période post-natale (Uhlenhaut et al., 2009). Ces travaux montrent que *Foxl2*, à l'image de *Dmrt1* dans le testicule, est nécessaire au maintien de la différenciation femelle chez la souris. Chez la femme, *FOXL2* est exprimé dans l'ovaire, les paupières et la glande pituitaire. Sa mutation est responsable du syndrome BPES (Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus) associant une réduction de l'ouverture des paupières (blepharophimosis), une paupière tombante (ptosis), une augmentation de la distance entre les yeux (telecanthus) et un pli de peau entre la paupière inférieure et supérieure (épicanthus inversus). Dans les BPES de type I, les anomalies des paupières sont associées à une insuffisance ovarienne prématurée (IOP). En fonction de la mutation, l'IOP est de degré variable et peut être primaire (Figure 12 et tableaux 3A et 3B). Il a été récemment mis en évidence une mutation de *FOXL2* responsable de tumeurs germinales ovariennes chez l'Homme et son rôle dans le maintien de la

différenciation des cellules de la granulosa a été mis en évidence (pour revue Georges et al., 2014). Il n'est pas établi, à l'heure actuelle, si *FOXL2* chez l'Homme joue un rôle à la fois dans le maintien du phénotype femelle et dans l'engagement initial vers la voie femelle. Cependant, chez le caprin dont le développement ovarien est long et asychrone comme chez l'Homme, *Foxl2* est proposé à la fois comme répresseur de la voie mâle pour maintenir le programme femelle dans l'ovaire adulte mais aussi comme facteur de détermination du sexe femelle précoce. En effet, la perte de fonction du gène est responsable d'une inversion sexuelle femelle vers mâle (Boulanger et al., 2014). L'expression des marqueurs de la voie mâle *Sox9*, *Amh* et *Dmrt1*, est régulée positivement tandis que les gènes de la voie femelle comme *Rspo1*, *Fst* (*Follistatin*) et *Stra8* (*Stimulated by retinoic acid 8*) sont réprimés. Cette étude souligne les différences inter-espèces dans le rôle des différents facteurs de détermination et maintien du sexe. Comme suggéré pour *DMRT1* chez le mâle, *FOXL2* pourrait, chez l'Homme, agir plus précocement dans la détermination du sexe ovarien.

La follistatine (FST) est une protéine modulant l'action des activines et inhibines (appartenant à la famille du TGFß). Les souris $Fst^{-/-}$ présentent une inversion partielle du sexe femelle vers mâle au cours de l'embryogénèse, suggérant un rôle précoce de FST dans la différenciation ovarienne. Elle a été proposée pour agir en aval de WNT4 afin d'inhiber la formation des vaisseaux cœlomiques présents chez le mâle en inhibant l'Activine B et maintenir la survie des CG dans le cortex ovarien (Yao et al., 2004). Plus récemment, l'équipe de Koopman propose une corégulation de *Fst* par WNT4 et FOXL2. Dans les stades précoces (11,5 jpc chez la souris), WNT4 serait le facteur majeur d'initiation de la transcription de *Fst*. Plus tardivement (15,5 jpc à naissance), FOXL2 en coopération avec BMP2 permet le maintien de l'expression de *Fst* (Kashimada et al., 2011a). Le mécanisme d'action de la follistatine n'est à l'heure actuelle pas clairement élucidé, notamment les effets sur les CG, mais cette protéine semble jouer un rôle important dans le développement de l'ovaire : rupture des nids ovigères et formation des follicules primordiaux mais aussi à des stades plus précoces du développement.

Les voies RSPO1/WNT4 et FOXL2 préviennent toutes les deux l'expression de *Sox9* et répriment la voie mâle pour maintenir l'état de différenciation des cellules de la granulosa. Les deux voies semblent indépendantes (Chassot et al., 2008; Ottolenghi et al., 2007) car les doubles mutants $Foxl2^{-/-}$;$Wnt4^{-/-}$ et $Foxl2^{-/-}$;$Rspo1^{-/-}$ présentent des anomalies plus importantes du développement ovarien que les mutants simples. Il semblerait de plus que l'expression de ces marqueurs soit supportée par des lignées cellulaires somatiques

différentes. Cela suggère l'importance des deux voies simultanément dans le développement ovarien. Les résultats présentés laissent à penser que plutôt qu'un facteur unique *Z*, plusieurs gènes agissent indépendamment ou en synergie pour engager la différenciation ovarienne et réprimer la voie mâle.

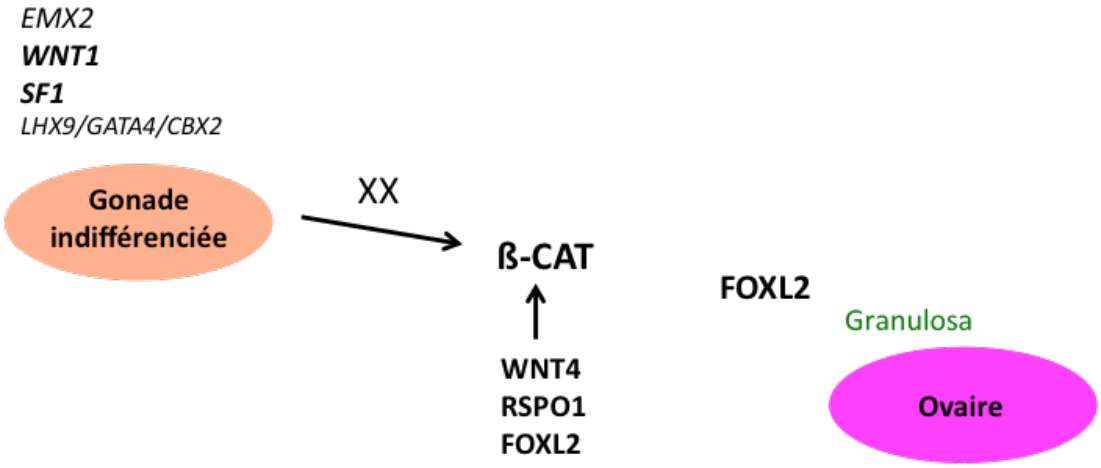


FIGURE 12 : Contrôle génétique de la détermination ovarienne chez la souris

Assemblage des follicules

L'origine de la lignée cellulaire de la granulosa a longtemps fait débat. L'étude des cellules somatiques dans les gonades d'embryons chimériques XX/XY a montré que dans les testicules, certaines cellules de Sertoli étaient XX et que l'on retrouvait dans les ovaires des cellules de la granulosa XY (Palmer and Burgoyne, 1991a; Palmer and Burgoyne, 1991b). Ce constat laisse à penser que les cellules de Sertoli et de la granulosa dérivent d'une même lignée cellulaire en partie déterminée par des signaux paracrines. Il est aujourd'hui admis que les cellules de la granulosa ont, comme les cellules de Sertoli, une origine cœlomique. Elles vont orchestrer la différenciation ovarienne et la maturation des CG par l'intermédiaire de signaux paracrines et vont entourer les cellules germinales pour former des follicules.

La formation des follicules primordiaux résulte d'un étroit dialogue entre les cellules germinales et somatiques. Si les cellules de la granulosa ne se différencient pas ou ne maintiennent pas leur état différencié, les follicules ne se forment pas et les CG meurent (Uhlenhaut et al., 2009). Contrairement à la formation des cordons testiculaires, la présence de cellules germinales est indispensable à la différenciation des cellules de la granulosa et à la

formation des follicules (Merchant, 1975). De plus, la perte de CG après la formation de ces follicules entraîne une transdifférenciation des cellules de la granulosa en cellules de « Sertoli-like » (Behringer et al., 1990; Hashimoto et al., 1990; McLaren and Buehr, 1990; Taketo et al., 1993; Yao et al., 2004). Si la méiose est retardée, on observera un décalage dans la formation des follicules. Inversement, si le *timing* de la méiose est accéléré , les ovocytes, chez le rat, atteignent plus rapidement la fin de prophase de première division de méiose et les follicules primordiaux se forment plus rapidement (Paredes et al., 2005). Le dialogue entre les cellules somatiques et germinales est primordial pour la différenciation des différentes lignées cellulaires ovariennes et un *timing* de développement ovarien adéquat.

Chez la souris, les CG entrent en méiose et parcourent la prophase I entre 13,5 et 15,5 jpc en suivant un axe rostro-caudal. A la naissance, les ovocytes sont groupés en amas et en seulement 72h, plus de 80% des ovocytes sont intégrés dans des follicules primordiaux (Pepling and Spradling, 2001). Après seulement 1 semaine, une centaine de follicules sont entrés en croissance (Peters, 1969). De nombreux facteurs paracrines sécrétés par les ovocytes et les cellules de la granulosa en différenciation signalisent l'assemblage des follicules. Le rôle exact de la plupart des acteurs reste encore à découvrir. Les ovocytes envoient un signal de formation des follicules lorsque les ovocytes arrivent au stade de diplotène de première division de méiose. L'expression de *Sycp1* diminue juste avant l'assemblage des follicules primordiaux (Paredes et al., 2005) et les ovocytes expriment le facteur de transcription *Folliculogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix* (*Figla* ou *Fig-alpha*). Lorsque ce facteur de transcription à motif hélice-boucle-hélice est muté chez la souris, les follicules ne se forment pas à la naissance (Soyal et al., 2000). FIGLA serait également impliqué dans l'expression des protéines Zp1, 2 et 3 de la zone pellucide qui entoure l'ovocyte et plus tardivement dans la croissance folliculaire. Une autre voie de signalisation important décrite est celle de la voie de signalisation NOTCH. Cette cascade de signalisation, conservée chez tous les métozoaires, est active lors de la formation des follicules primordiaux. Sa suppression dans l'ovaire néonatal de souris entraîne une diminution importante du nombre de follicule primordiaux formés (Trombly et al., 2009). Le récepteur Notch homolog 2 (NOTCH2) est exprimé par les cellules de la granulosa et un de ses ligands, Jagged1 (JAG1), est sécrété par les ovocytes. Sont décrits également comme activateurs de l'assemblage folliculaire les facteurs de croissance comme la Connective tissue growth factor (CTGF) et l'Activine A (facteur de croissance de la famille du TGF-β). En revanche, l'AMH, FGF2 et le facteur de nécrose tumorale, Tumor necrosis factor alpha (TNFα) sont décrits comme inhibiteurs de

l'assemblage des follicules primordiaux (Nilsson et al., 2013). L'assemblage correct des follicules résulte certainement d'une expression variable de ces facteurs permissifs et répresseurs dans le temps et dans l'espace.

Chez l'Homme, les toutes premières CG entrent en méiose vers 10 sg et parcourent la première division méiotique jusqu'au stade diplotène. Le *timing* d'apparition des premiers follicules est peu clair chez l'Homme et est décrit entre 15 et plus de 20 sg en fonction des publications, dans la partie interne du cortex ovarien en premier (Maheshwari and Fowler, 2008; Geber et al., 2012). L'entrée en méiose et l'assemblage folliculaire se fait de manière asynchrone chez l'Homme pendant toute la vie fœtale et on observe des follicules secondaires et pré-antraux à partir du 3ème trimestre de grossesse. Il est établi qu'à la naissance, la petite fille nait avec un pool de follicules primordiaux déterminé (environ 1-2 millions selon les publications). Des CG mitotiques sont encore présentes en fin de vie fœtale (données non publiées du laboratoire) et un possible assemblage folliculaire en période périnatale et plus tardivement n'est donc pas exclu et reste à étudier. Même si l'expression de certains facteurs décrits chez la souris dans l'assemblage folliculaire est retrouvée chez l'Homme, comme FIGLA (Fowler et al., 2009), les mécanismes chez l'Homme se distinguent très certainement pour que divers stades de différenciation des CG coexistent dans l'ovaire fœtal humain. Une autre différence importante avec le modèle murin réside dans le fait que la formation des follicules primordiaux débute pendant la vie fœtale chez l'Homme et non après la naissance. A ce moment, le fœtus est exposé aux stéroïdes maternels. Le taux d'œstradiol chez la femme enceinte est d'environ 20 à 40 nmol/L (Fowler et al., 1998) et l'équipe de Fowler retrouve une augmentation de l'expression des récepteurs aux œstrogènes ESR1/ESR α et ESR2/ESRß et de l'aromatase dans des ovaires fœtaux âgés de 12 à 20 sg, ce qui laisse penser d'une part que, chez l'Homme, les cellules de la granulosa fœtales sont capables d'aromatiser les androgènes circulants en œstradiol et que d'autre part la voie des œstrogènes serait impliquée dans le développement de l'ovaire fœtal (Fowler et al., 2009). Cependant, contrairement au rongeur, le placenta humain produit de fortes quantités d'aromatase (Kamat et al., 1998) et un phénotype de pseudohermaphrodisme chez les fœtus féminin est observé en cas de mutation de l'aromatase (Simpson et al., 1997).

L'assemblage des cellules folliculaires (pré-granulosa) avec les ovocytes pour former les follicules primordiaux est une étape cruciale conditionnant la fertilité adulte de la femme. Les mécanismes en jeu sont à élucider chez l'Homme car un défaut dans cette étape peut conduire à une réduction du pool de follicules primordiaux et une insuffisance ovarienne prématurée.

Les cellules de la thèque : l'autre type cellulaire somatique majeur des follicules :

Les cellules de la thèque sont des cellules aplaties d'aspect fibroblastique qui constituent les couches vascularisée et endocrine (synthèse des stéroïdes) du follicule mature. Leur origine est mésenchymateuse (Peters, 1969). Les mécanismes de différenciation des cellules de la thèque sont encore mal connus. De la même manière qu'on suppose l'existence d'un précurseur commun aux cellules de soutien dans l'ovaire et le testicule (cellules de la granulosa et cellules de Sertoli), on suspecte un précurseur commun des cellules d'activité stéroïdogène (cellules de la thèque et cellules de Leydig). Sur cette hypothèse, il est logique de penser que la voie de signalisation induite par le ligand DHH induit la différenciation des cellules de la thèque, comme elle le fait pour les cellules de Leydig. Cette voie de signalisation agit *via* le récepteur Patched 1 (PTCH1) et le facteur de signalisation intracellulaire GLI family zinc finger 1 (GLI1). Dans l'ovaire post-natal murin, les cellules de la thèque expriment *Ptch1* et *Gli1* et les cellules de la pré-granulosa produisent DHH (Wijgerde et al., 2005). La voie de signalisation DHH pourrait donc avoir un rôle dans la différenciation des cellules de la thèque dans l'ovaire.

Les cellules de la thèque vont être recrutées par les follicules en croissance *via* des facteurs paracrines comme ceux de la voie KIT/KITL. Les cellules de la pré-granulosa produisent KITL/SCF, et le récepteur KIT est présent à la surface des ovocytes et des cellules de la thèque (Driancourt et al., 2000; Nilsson and Skinner, 2002). Le Growth differentiation factor 9 (GDF9) est sécrété par les ovocytes (Dong et al., 1996; Carabatsos et al., 1998; Vitt et al., 2000) et semble impliqué dans la différenciation des cellules de la thèque. En effet, il est décrit chez la souris *Gdf9*$^{-/-}$, un arrêt de la croissance folliculaire au stade primaire et un non recrutement des cellules de la thèque (Dong et al., 1996). Chez la souris, le recrutement des cellules de la thèque matures a lieu après la naissance. Les cellules expriment le récepteur à la LH et, sous l'action de cette gonadotrophine, synthétisent les androgènes qui seront aromatisés en œstradiol par les cellules de la granulosa (Erickson et al., 1985). Le complexe oestradiol/ESR1 transloque dans le noyau, réprime la transcription de *Sox9*, et assure, avec FOXL2, le maintien de la différenciation des cellules de la granulosa. Chez la souris, lorsque la voie des œstrogènes est bloquée, le développement fœtal de l'ovaire est normal mais on observe une transdifférenciation des cellules de la granulosa en cellules de Sertoli-like après la naissance (Britt and Findlay, 2003). Chez l'Homme, les cellules de la thèque expriment également le récepteur à la LH. Pendant la vie fœtale, on peut supposer que les cellules de la

thèque se différencient sous l'action de la LH fœtale et produisent les androgènes qui seront aromatisés en œstrogène par le placenta et peut-être la gonade elle-même.

Conclusion

La détermination sexuelle commence par l'engagement des cellules somatiques de la gonade dans une voie de différenciation en fonction du sexe chromosomique de l'individu. L'existence de deux voies de différenciation (mâle et femelle) permet l'obtention d'individus phénotypiquement différents (homme et femme) qui produiront des gamètes différents (spermatozoïdes et ovocytes). Cependant, le but final est le même : produire des gamètes et des appareils reproducteurs compétents nécessaires pour la reproduction et la pérennisation de l'espèce. L'origine embryonnaire initiale des lignées cellulaires étant commune, il est logique de retrouver des similitudes entre le développement testiculaire et ovarien même si les mécanismes moléculaires et les cinétiques de développement diffèrent. Dans les testicules, les cellules germinales sont soutenues par les cellules de Sertoli (origine cœlomique, récepteurs à la FSH) et emprisonnées dans des cordons testiculaires entourés d'une membrane basale isolant les CG des autres cellules somatiques et de la vascularisation. Dans le tissu interstitiel, les cellules de Leydig (origine mésenchymateuse, récepteurs à la LH), proches des capillaires sanguins, vont assurer l'activité de stéroïdogénèse du testicule. Dans l'ovaire, chaque CG est entourée de cellules folliculaires (granulosa) d'origine cœlomique (récepteurs à la FSH principalement) pour former des follicules. Les follicules sont entourés d'une membrane basale les isolant du stroma et de la vascularisation. Dans le tissu interstitiel, les cellules de la thèque (origine mésenchymateuse, récepteurs à la LH) produisent les hormones ovariennes.

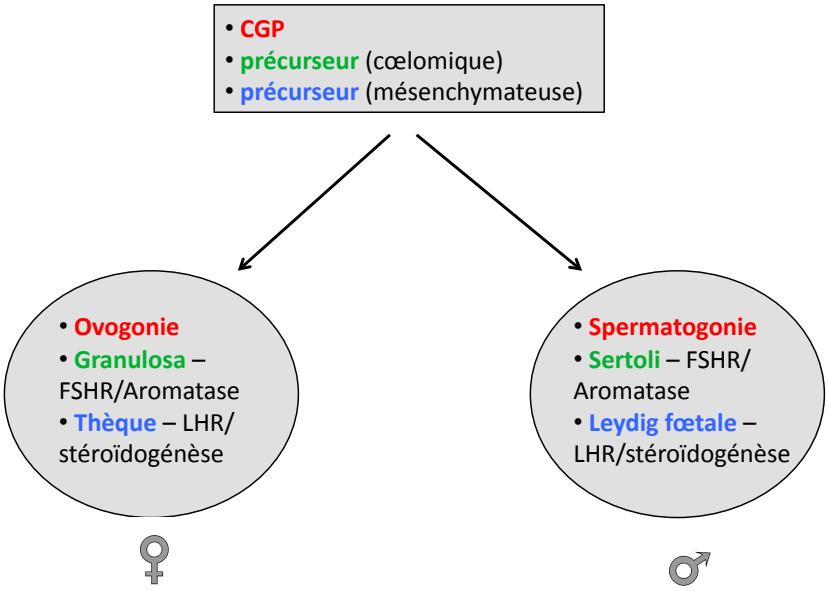


FIGURE 13 : Principales lignées cellulaires dans les gonades fœtales femelle et mâle et leurs précurseurs

3.2.2.3 Antagonisme voie mâle - voie femelle

Contrairement au cas d'autres vertébrés chez qui la détermination du sexe est liée à l'environnement (température, environnement hormonal etc..), on pourrait croire que chez le mammifère, pour qui la détermination sexuelle est chromosomique, l'engagement dans une voie de différenciation sexuelle est irréversible. Etonnamment, de nombreuses études montrent le contraire. Par exemple, l'invalidation conditionnelle de *Foxl2* dans l'ovaire postnatal murin entraîne rapidement une surexpression des facteurs testiculaires *Sox9* et *Dhh* responsables d'une dédifférenciation des cellules de la granulosa en cellules de « Sertoli-like » et un inversion sexuelle femelle vers mâle (Uhlenhaut et al., 2009). Ces données indiquent que le phénotype 'ovaire' n'est pas irréversible après la détermination sexuelle et qu'il nécessite d'être maintenu tout au long de la vie. Chez la souris, *Foxl2* participe au maintien du sexe femelle en réprimant l'expression de *Sox9*. Cependant, chez le caprin, *Foxl2* est proposé pour réprimer la voie mâle et maintenir le programme femelle dans l'ovaire adulte mais aussi comme facteur de détermination du sexe femelle précoce. La perte de fonction du

gène est responsable d'une inversion sexuelle femelle vers mâle (Boulanger et al., 2014). Ces données montrent une importante diversité du rôle de FOXL2 selon l'espèce ou une pondération variable des acteurs contrôlant la détermination sexuelle initiale (Figure 14).

De la même manière, l'invalidation chez la souris de *Dmrt1* dans le testicule post-natal entraîne une surexpression de *Foxl2*, une diminution de l'expression de *Sox9* et une transdifférenciation des cellules de Sertoli en cellules de la granulosa (Matson et al., 2011) (Figure 14).

Ces données suggèrent que le phénotype de la gonade est maintenu en réprimant la voie du sexe opposé. Il a été récemment montré chez Tilapia que *Foxl2* et *Dmrt1* ont des rôles antagonistes dans la différenciation sexuelle *via* la production d'œstrogènes (Li et al., 2013). *Foxl2* va stimuler l'expression de l'aromatase (*Cyp19a1*) et donc la production d'œstrogènes. Dmrt1 va bloquer l'expression de l'aromatase et la production d'œstrogènes féminisants. Il a été montré chez l'Homme que *CYP19A1* est une cible directe de *FOXL2* dans des lignées cellulaires de cellules de la granulosa ce qui pourrait suggérer que ce mécanisme est conservé (Fleming et al., 2010).

En période fœtale, au moment de la détermination sexuelle, un scénario identique d'antagonisme entre les voies mâle et femelle est décrit (cf précédemment). *Sox9* et *Fgf9* répriment la voie de signalisation *Wnt4/β–Cat* et inversement (Kim et al., 2006). Cependant, de récentes études chez la souris rapportent un développement testiculaire chez les individus XY *Fgf9*$^{-/-}$; *Wnt4*$^{-/-}$ (Jameson et al., 2012) et *Sox9*$^{-/-}$; *Rspo1*$^{-/-}$ (Lavery et al., 2012). Ces données suggèrent que *Sox9* ne serait pas absolument nécessaire au développement testiculaire et que le rôle de FGF9 serait plus de réprimer le programme femelle que de soutenir le programme mâle. Chez les individus XX, le phénotype d'inversion sexuelle partielle n'était pas différent de celui des mutants simples *Wnt4*$^{-/-}$ ou *Rspo1*$^{-/-}$ (Jameson et al., 2012; Lavery et al., 2012). Cependant, la détermination sexuelle faisant partie des grandes étapes du développement, on peut penser que d'autres *Fgf* ou *Sox* agissent de manière redondante (Figure 14).

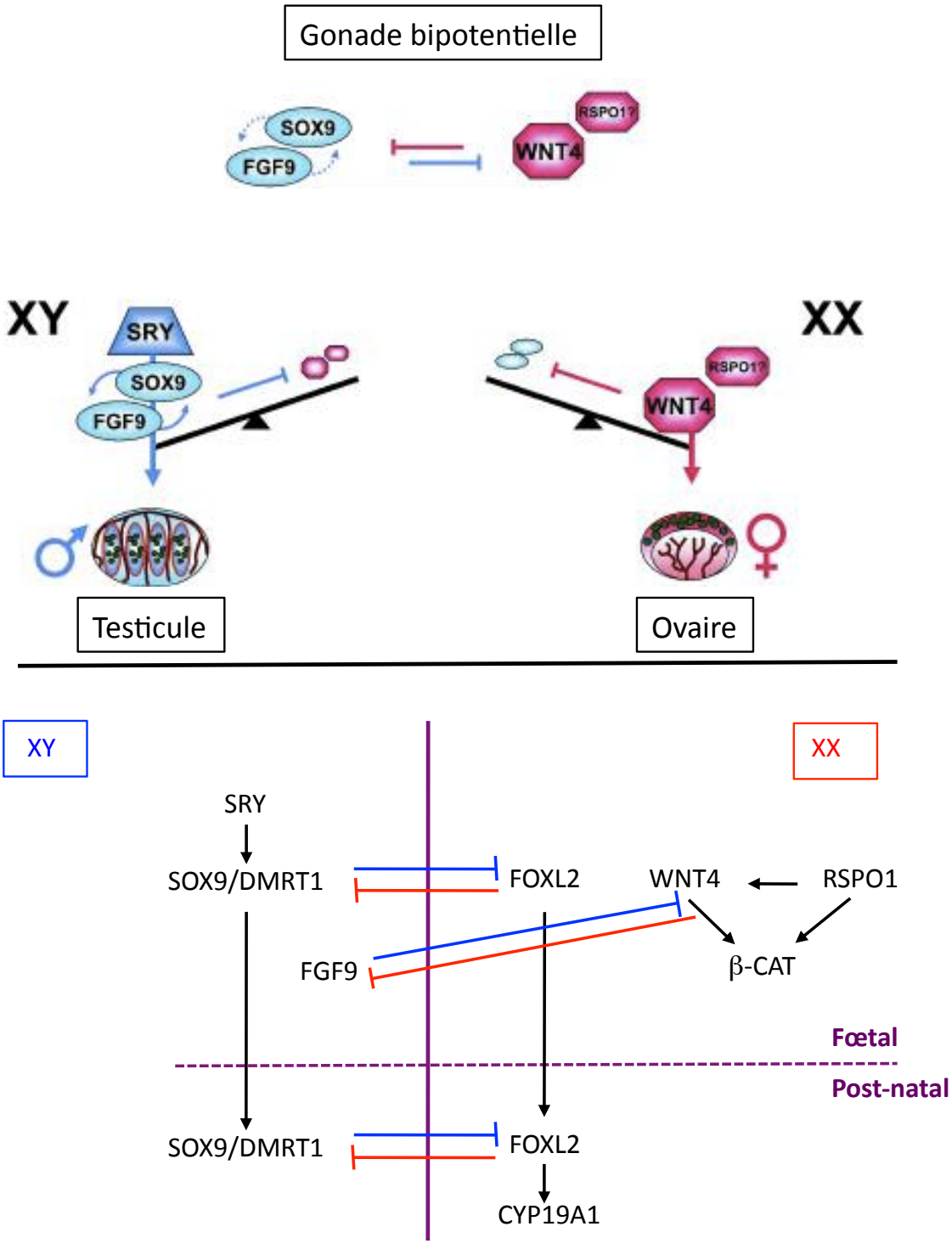


FIGURE 14 : Schéma résumant l'antagonisme des voies de différenciation somatique mâle/femelle

D'après DiNapoli and Capel (2008)

Chez les mammifères, lorsque la gonade se forme, elle est indifférenciée. Le sexe chromosomique de l'individu va engager la gonade dans une voie de différenciation mâle si il est XY ou femelle si le sexe est homogamétique. Le sexe chromosomique va permettre l'activation en cascade de gènes induisant l'engagement des cellules somatiques de l'organe vers une voie tout en réprimant l'autre voie pour maintenir l'état de différenciation. Les mécanismes moléculaires en jeu ont été principalement étudiés chez le rongeur et sont encore mal compris chez l'Homme. Le développement plus long et asynchrone de la gonade fœtale chez l'Homme suggère que les mécanismes diffèrent de ceux décrits chez le rongeur. De plus, les patients mutés pour des facteurs décrits comme nécessaires chez la souris présentent un phénotype souvent moins critique que le modèle animal. Ce constat soutient l'hypothèse de mécanismes divergents ou de redondance plus fortes dans une même famille de gènes chez l'Homme. Cette redondance aurait pu être acquise au cours de l'évolution pour protéger les grandes voies de signalisation développementale.

3.2.3 Détermination du sexe germinal

Nous avons présenté précedemment les mécanismes de différenciation somatique qui orchestrent la différenciation gonadique. Les cellules somatiques vont imposer aux cellules germinales la voie de différenciation qu'elles ont emprunté. Inversement, la multiplication des CG dans la gonade contribue à la formation et la croissance de l'organe, puis à la différenciation gonadique et au maintien du phénotype sexuel. La différenciation somatique est indissociable de la différenciation germinale.

Différents noms sont donnés aux cellules germinales en fonction de leur état de différenciation et des marqueurs qu'elles expriment. A leur arrivée dans la gonade indifférenciée, les cellules germinales primordiales vont prendre le nom de CGP post migratoires. Le terme de gonocyte employé pour la première fois par Clermont et Perey en 1957 désigne les CG après leur arrivée dans la gonade, aussi bien chez le mâle que chez la femelle (Clermont and Perey, 1957). Cependant, en pratique, ce terme est plus largement utilisé pour désigner les CG dans la gonade mâle quel que soit leur stade de différenciation. Dans l'ovaire, on appellera ovogonie la CG non méiotique et ovocyte la CG entrée en méiose. Dans le testicule, en vie fœtale, la CG prendra le nom de pré-spermatogonie (ou

prospermatogonie) et à l'âge adulte on désignera par spermatogonie la CG pré-méiotique et par spermatocyte la CG entrée en méiose.

A leur arrivée dans la gonade indifférenciée, les CGP sont également sexuellement indifférenciées. C'est à dire que quel que soit le contenu chromosomique des CG, toutes sont capables d'entrer en quiescence ou initier la méiose en fonction de l'environnement somatique. En effet, chez la souris, les CGP post-migratoires peuvent se différencier en cellules de type prospermatogonie au contact d'un environnement somatique testiculaire et en cellules de type ovogonie dans un environnement ovarien qu'elles soient XX ou XY (Palmer and Burgoyne, 1991a; Palmer and Burgoyne, 1991b). Les mécanismes responsables de cette dichotomie du destin sexuel des CG restent peu détaillés chez l'Homme mais quelle que soit la voie empruntée, les CG vont proliférer, perdre leurs marqueurs de pluripotence et acquérir des marqueurs spécifiques de la lignée germinale. Dans la voie femelle, les CG entreront en méiose pendant la vie fœtale. Chez le mâle, l'entrée en méiose sera réprimée en période fœtale et les CG resteront « quiescentes » jusqu'à la puberté.

3.2.3.1 Morphologie des CGP post-migratoires

A leur arrivée dans la gonade indifférenciée vers 6 sg chez l'Homme et 10,5 jpc chez la souris, les CG sont sexuellement indifférenciées et leur morphologie identique qu'elles soient porteuses d'un ou de deux chromosomes X. Elles expriment les marqueurs de pluripotence et de survie décrits précédemment (paragraphe 2.2.2). Une fois la gonade colonisée, les CG perdent leur capacité migratoire, se regroupent, deviennent plus grosses et se distinguent histologiquement des cellules somatiques sans marquage spécifique. Elles arborent une grande taille, un profil arrondi et un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (McKay et al., 1953) (Figure 15).

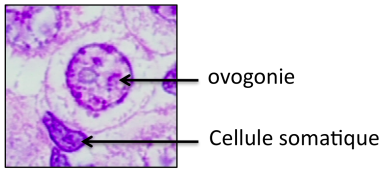


Figure 15 : ASPECT HISTOLOGIQUE D'UNE OVOGONIE HUMAINE
Coupe d'ovaire de 8 sg (coloration hématoxyline éosine) au grossissement x100 (données personnelles)

3.2.3.2 Prolifération/apoptose des gonocytes

La différenciation correcte des CG dépend d'un équilibre délicat entre des signaux de prolifération et d'aptotose provenant des cellules somatiques environnantes. Jusqu'à leur différenciation, les gonocytes vont activement proliférer. De nombreux facteurs autocrines et paracrines vont participer à leur survie et leur prolifération tels que KITL agissant sur le récepteur KIT exprimé à la surface des CG (Dolci et al., 1991; Matsui et al., 1992). Chez la souris, la perte d'expression de *Bmp7* et *Fgf9* entraîne une diminution importante du nombre de CG, suggérant leur implication dans la survie et la prolifération des CG (DiNapoli et al., 2006; Ross et al., 2007). Des études *in vivo* ont montré que l'Interleukin 2 (IL2) (Eguizabal et al., 2007), l'acide rétinoïque (AR) (Koshimizu et al., 1995), le TNFα, le BMP4 et le FGF2 (Resnick et al., 1992) sont également impliqués dans la prolifération des CG. D'autres facteurs comme IL4, 6 et 11 et le LIF contribuent, quant à eux, à la survie des CG par la suppression d'effets apoptotiques (De Felici and Dolci, 1991; Cooke et al., 1996; Koshimizu et al., 1996) (Figure 16).

A l'inverse, des facteurs de croissance tels que l'Activine et le TGFß vont freiner la prolifération des CG (Richards et al., 1999). De même, la voie de signalisation WNT/ß-CAT retarde la progression du cycle cellulaire des CG et une activation précoce de cette voie entraîne un diminution du nombre final de CG (Kimura et al., 2006). Il est décrit, chez le rongeur, deux vagues d'apoptose à la suite desquelles 70% des CG ont disparu. La première a lieu autour de 13,5 jpc chez la femelle et entre 13,0 et 17 jpc chez le mâle, la deuxième entre 15,5 jpc et la naissance chez la femelle et en périnatal chez le mâle (Pepling and Spradling, 2001). L'apoptose des CG va être régulée dans les gonades par la balance entre l'expression de deux membres de la famille de B-cell lymphoma/leukemia -2 (BCL2) : le gène de survie cellulaire *Bcl2l1* et le gène pro-apoptotique *Bax* (Ratts et al., 1995) (Figure 16).

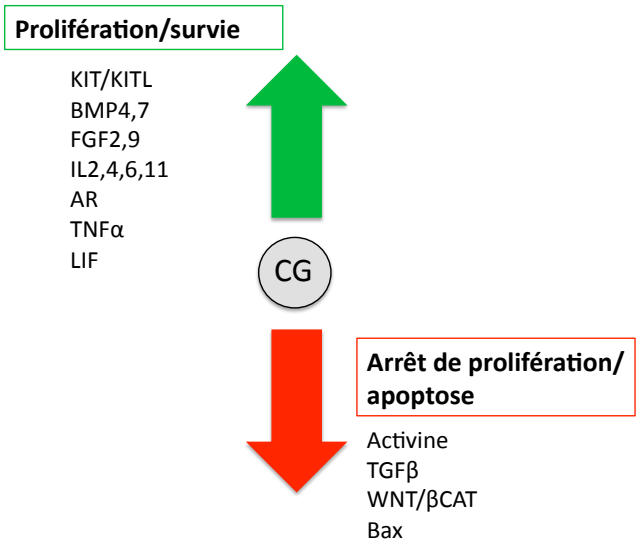


FIGURE 16 : Principaux facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération des CG
Représentation schématique non exhaustive des différents facteurs impliqués dans la prolifération et la survie des CG ou dans l'arrêt du cycle cellulaire et la mort programmée de ces mêmes CG. Le nombre final de CG dans une gonade adulte dépendra en partie d'un équilibre adéquat entre ces différentes voies.

Chez l'Homme, on observe également une forte activité mitotique des gonocytes. Peu d'études ont réalisé des comptages cellulaires sur gonades entières datées et les résultats sont parfois très différents d'une étude à l'autre. En moyenne, dans le testicule, le nombre de gonocytes augmente d'environ 10 000 à 6 sg à ~ 75 000 à 9 sg et 360 000 à 12 sg (Mamsen et al., 2011). Malgré une probable entrée en quiescence des CG vers la 12ème semaine de gestation, la prolifération des CG continue avec une estimation à ~ 1,5 Millions de CG à 19 sg. Dans l'ovaire, la prolifération des ovogonies est particulièrement intense de 6sg à 9sg où l'on passe d'environ 10 000 CGP post-migratoires à 6 sg à ~ 150 000 ovogonies à 9 sg. Les toutes premières CG entrées en méiose ont été observées vers 10 sg mais la plupart des ovogonies sont encore mitotiques et la prolifération se poursuit. Le nombre de CG dans l'ovaire est estimé à ~ 5 Millions à 19 sg (Mamsen et al., 2011). Chez l'Homme, les facteurs pouvant influencer la balance prolifération/apoptose des gonocytes sont peu décrits. Certains facteurs décrits chez la souris sont retrouvés chez l'Homme tels que le récepteur KIT et le facteur de survie et de prolifération SCF/KITL. L'expression de *KIT* diminue dans l'ovaire avant l'entrée en méiose des CG. Dans un modèle *in vitro* de culture de gonocytes issus de fœtus âgés de 12 à 22 semaines de gestation, le SCF induit une augmentation de l'index de prolifération de ces cellules (Tu et al., 2007). L'expression de l'*IL6* et des gènes codants pour la voie de signalisation de cette cytokine a été détectée dans des ovaires fœtaux humains de 8 à 20 sg (Eddie et al., 2012). Ces résultats confirment que des effets paracrines semblables à

ceux observés chez le rongeur régulent la prolifération des gonocytes humains et demeurent à étudier.

3.2.3.3 Perte de pluripotence et acquisition des marqueurs de la lignée germinale

Le profil d'expression de gènes des CG change lorsqu'elles colonisent la gonade (pour revue Ewen and Koopman, 2010). Chez la souris, l'expression des marqueurs de CGP présents avant la colonisation et décrits précédemment tels que *Tnap*, *Kit*, *Ssea1, Nanos3* et *Prdm1* diminue. Les gonocytes acquièrent un nouveau panel de marqueurs tels que Germ cell nuclear antigen 1 (GCNA1), un antigène nucléaire spécifique des CG mâles et femelles à partir de 11.0 jpc et jusqu'au stade diplotène tardif de méiose I (Enders and May, 1994), TRA98 (GENA), un autre antigène nucléaire spécifique des cellules germinales, Delated in azoospermia like (DAZL), une protéine de liaison aux ARN exprimée dans les CG des deux sexes de 11,5 jpc à la fin de la gamétogénèse et impliquée dans la différenciation des CG (Saunders et al., 2003) et le récepteur nucléaire orphelin Estrogen related Receptor beta (ESRRB/ERRβ/NR3B2) qui serait impliqué dans la multiplication des CG (Mitsunaga et al., 2004). L'équivalent murin de *Vasa* (*Vasa/Ddx4/Mvh*), une protéine de la famille des ARN hélicases impliquée dans la spermatogénèse et la division cellulaire est également surexprimée spécifiquement dans les CG mâles et femelles (Tanaka et al., 2000). Cette protéine initialement décrite dans le développement des CG chez la Drosophile femelle est spécifique de la lignée germinale et universellement utilisée comme marqueur de la lignée germinale. Au moment de la spécification, les CG sont programmées pour maintenir un état de pluripotence tout en acquérant des marqueurs de la lignée germinale. Une fois la gonade colonisée, cette plasticité disparaît et les CG se différencient. Elles continuent cependant d'exprimer certains marqueurs de pluripotence comme *Oct4*, *Nanog* et *Sox2* jusqu'à la différenciation sexuelle. Les facteurs régulant l'expression des gènes de pluripotence dans les prospermatogonies sont peu connus. Cependant, l'invalidation conditionnelle de *Dmrt1* dans les CG, induit une augmentation significative de l'expression de *Sox2*, *Nanog* et *Oct4*. Ce résultat peut laisser suspecter un effet de *Dmrt1* sur la diminution d'expression des gènes de pluripotence dans les prospermatogonies (Krentz et al., 2009).

Chez l'Homme, nous avons décrit précédemment que les CGP expriment des facteurs de pluripotence tels que *OCT4*, *NANOG*, *KIT*, *SSEA1* et la *TNAP* et le marqueur oncogénique *TFAP2C* à leur arrivée dans la gonade (Rajpert-De Meyts et al., 2004; Hoyer et al., 2005; Kerr et al., 2008b). Comme chez la souris, l'expression de ces marqueurs va diminuer progressivement au profit de l'expression de marqueurs spécifiques de la lignée germinale comme *DDX4/VASA* et *DAZL*. Cependant, le développement asynchrone de la gonade humaine permet de distinguer plusieurs populations cellulaires qui coexistent à un moment donné d'observation. Au fur et à mesure du développement, les populations de cellules les plus différenciées seront les plus représentées. Chez le mâle, la plupart des gonocytes n'expriment plus *TNAP*, *OCT4* et *NANOG* en fin de premier trimestre de gestation et l'expression de *KIT* et *TFAP2C* diminue très fortement au cours du second trimestre (Pauls et al., 2005). Leur expression est retrouvée, bien que faiblement, jusqu'à des âges tardifs de gestation étudiés grâce à des IMG, ce qui confirme la différenciation asynchrone chez l'Homme. Les gonocytes acquièrent parallèlement l'expression du marqueur *DDX4*, spécifique des CG chez l'Homme également (Castrillon et al., 2000). En fin de premier trimestre de gestation, moins de 5% des gonocytes sont positivement marqués pour DDX4 alors que la protéine est détectable dans le cytoplasme de la plupart des CG à partir de 20 sg (Anderson et al., 2007). L'expression du facteur prospermatogonial *Melanoma associated antigen A4* (*MAGEA4*) est maximale en fin de deuxième trimestre de gestation (pour revue Culty, 2009) (Figure 17).

La plupart des études réalisées sur les gonades humaines décrivent indépendamment les marqueurs testiculaires et ovariens et la majorité des données ont été collectées à partir de prélèvements mâles. Les rares études réalisées sur l'ovaire fœtal humain décrivent cependant une coexistence de populations de CG à différents stades de différenciation. Trois études ont étudié la cinétique d'apparition/disparition de marqueurs d'ovogonies et d'ovocytes différenciés. Deux d'entre-elles ont été réalisées à partir de prélèvements du premier et second trimestre (jusqu'à 15 sg par Kerr et col. (Kerr et al., 2008b) et 19 sg par Anderson et col. (Anderson et al., 2007)). Seule l'équipe de Stoop et col. a pu étudier des prélèvements plus tardifs jusque 38 sg (Stoop et al., 2005). Le nombre de cellules positives pour le marqueur *OCT4* augmente dans l'ovaire à partir de 8 sg et le niveau d'expression d'*OCT4* est alors supérieur à celui observé dans le testicule (Anderson et al., 2007). Cette expression va ensuite diminuer à partir de 11 sg en même temps que l'expression de *NANOG* dans les CG du cortex profond en premier (Kerr et al., 2008b), lieu de différenciation des premiers ovocytes.

L'expression d'*OCT4* diminue mais reste cependant plus élevée à 15 sg dans l'ovaire en comparaison au testicule. Les cellules positives pour ce marqueur sont régionalisées dans la partie externe du cortex ovarien (Stoop et al., 2005). L'expression de *SSEA1* diminue également progressivement mais reste détectable jusque 13-15 sg, tout comme l'expression de *KIT* (Kerr et al., 2008b). *KIT* sera plus tardivement exprimé de nouveau par les cellules stromales au moment de la folliculogénèse. L'expression du marqueur germinal *DDX4* augmente fortement à partir du 2nd trimestre de gestation (Anderson et al., 2007). Jusqu'à 15 sg, on détectera encore une petite proportion de cellules *OCT4*+/*SSEA1*+/*DDX4*+ mais à partir de 13 sg, la plupart des ovogonies n'expriment plus *OCT4*, *NANOG*, *KIT* et *SSEA1* (Kerr et al., 2008b) (Figure 17).

En résumé, les CGP post-migratoires se différencient en gonocytes lorsqu'elles colonisent la gonade fœtale. Elles perdent les marqueurs de pluripotence et leur plasticité pour exprimer de nouveaux marqueurs dont certains, comme DDX4, GCNA1, TRA98 ou DAZL sont spécifiques des CG. L'environnement somatique de la gonade dicte très certainement cette différenciation mais on peut penser que d'autres facteurs comme la cinétique du cycle cellulaire interviennent. Chez l'Homme, le long développement de la gonade permet de distinguer différentes populations de gonocytes, de proportions variables en fonction du stade de développement et d'étudier la cinétique d'apparition/disparition de chaque marqueur. Il a été proposé que les cellules se différencient par vagues successives, ce qui pourrait expliquer l'asynchronie observée mais le devenir des cellules issues de chaque vague est incertain et peu clair (apoptose ou poursuite de la différenciation).

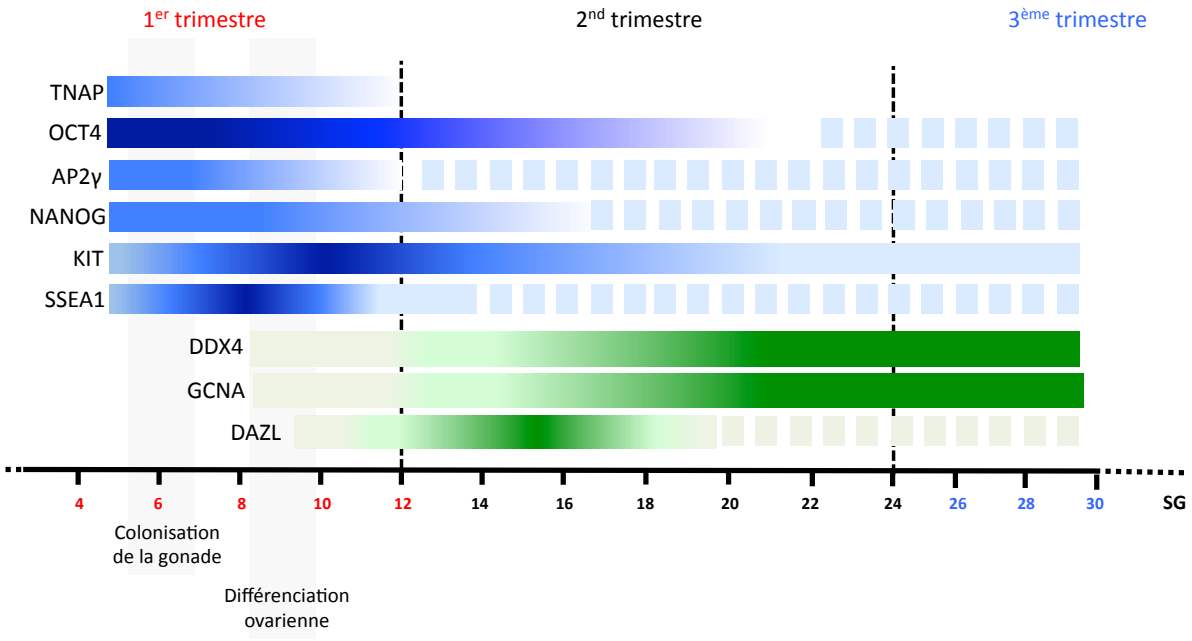


FIGURE 17 : Ontogénèse des marqueurs des cellules germinales dans l'ovaire fœtal humain
Cette représentation schématique montre la fenêtre d'expression des principaux marqueurs des CG dans l'ovaire fœtal humain. Les marqueurs de pluripotence (en bleu) disparaissent au profit de l'expression de marqueurs germinaux (en vert). Un trait plein signifie une expression plus ou moins forte en fonction de l'intensité de la couleur. Un trait pointillé signifie que très peu de CG expriment ce marqueur et une absence de trait signifie que le marqueur a presque totalement disparu (Stoop et al., 2005; Anderson et al., 2007; Kerr et al., 2008b).

Quid de la persistance de cellules souches ovariennes ?

Depuis quelques années, le dogme qui consiste à croire que l'ovaire post-natal ne contient plus de cellules souches germinales (non entrées en méiose) a été ébranlé. En effet, chez l'Homme, l'expression de *KIT*, *OCT4* et *NANOG* est encore détectable dans des ovaires fœtaux du troisième trimestre de gestation (Kerr et al., 2008b; Childs et al., 2012). Au deuxième trimestre de gestation, une population d'ovogonies *OCT4+/SSEA1+/KIT-/DDX4-* persiste malgré l'entrée en méiose de la plupart des CG (Kerr et al., 2008b). Ces cellules n'expriment pas le marqueur méiotique *Synaptonemal complex protein 3* (*SYCP3*) qui sera détaillé plus loin (Childs et al., 2012) et conservent une activité de prolifération (Stoop et al., 2005). Ces résultats d'ordre observationnel confirment que l'entrée en méiose est très asynchrone dans l'ovaire fœtal humain (Skrzypczak et al., 1981) et rendent concevable qu'une sous-population d'ovogonies échapperaient à la méiose et à l'apoptose (Fulton et al., 2005) gardant ainsi un potentiel souche. Ces cellules décrites dans l'ovaire fœtal n'ont pas été caractérisées et nous ne savons pas à l'heure actuelle si elles sont destinées à disparaître ou si elles sont dans un état « quiescent », capables de se différencier plus tard en ovocytes

compétents. L'amélioration de nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans leur maintien est donc primordiale.

3.2.3.4 DAZL : le signal de compétence pour la différenciation ?

Des facteurs extrinsèques somatiques dictent aux CG leur prolifération et leur arrêt mitotique ou leur entrée en méiose. Il existe sûrement un facteur intrinsèque aux CG qui leur confère la capacité à répondre ou non à ces facteurs extrinsèques et se différencier. Sinon, les cellules somatiques autour des CG entreraient également en méiose puisqu'elles sont soumises aux mêmes facteurs diffusibles. Le gène *Delated in azoospermia like* (*Dazl*) appartient à la famille des gènes « Deleted in Azoospermia », comprenant également les gènes *Daz* et *Boule*, codants pour des protéines de liaison aux ARN spécifiquement exprimées par les CG dès la colonisation des gonades et requises pour le développement de la lignée germinale. DAZL est un bon candidat de facteur intrinsèque de compétence à leur différenciation. En effet, chez la souris, en absence de *Dazl*, les CG ovariennes et testiculaires expriment *Mvh* suggérant qu'elles conservent leur identité germinale mais elles restent dans un état sexuellement indifférencié proche des CGP et meurent finalement par apoptose. L'expression des gènes impliqués dans la pluripotence (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) est maintenue (Lin et al., 2008; Gill et al., 2011). Les CG des deux sexes continuent de proliférer et sont positives pour le marqueur Ki67 à 15,5 jpc. Ce marquage suggère que les CG XY n'ont pas effectué l'arrêt mitotique et la transition G1/G0 et que les CG XX ne sont pas entrées en méiose (Gill et al., 2011). Dazl pourrait représenter pour les cellules germinales le permis de répondre aux signaux somatiques, de sortir de l'état de pluripotence et d'acquérir la compétence à se différencier sexuellement.

Dans le testicule fœtal humain, il a été montré que l'expression de *DAZL* précède la diminution d'expression d'*OCT4*. DAZL est localisé dans les noyaux des gonocytes au premier trimestre de gestation et est ensuite retrouvée dans le cytoplasme des CG à partir du second trimestre (Anderson et al., 2007). Des études *in vitro* réalisées sur des cellules humaines pluripotentes (hES) indiquent qu'il est possible d'obtenir des CG *in vitro* et que DAZL est nécessaire à la différenciation des CG avant l'entrée en méiose et *Delated in azoospermia* (*DAZ*) et *Boule-like RNA-binding protein* (*BOLL*) requis pour la progression méiotique (Kee et al., 2009).

3.2.3.5 Engagement dans la gamétogénèse

Les CG perdent progressivement leurs marqueurs de pluripotence et acquièrent des marqueurs spécifiques de la lignée germinale et de leur entrée en différenciation. En fonction de l'environnement somatique de la gonade, elles vont s'engager vers une voie de différenciation mâle ou femelle que nous allons détailler maintenant.

Nous présenterons dans un premier temps les grandes étapes de l'engagement dans la gamétogénèse mâle et femelle avant de détailler les mécanismes moléculaires permettant cette dichotomie. Les principes fondamentaux de la méiose seront exposés à la fin de cette partie concernant la gamétogénèse.

3.2.3.5.1 Engagement dans la gamétogénèse mâle

L'engagement des CG vers la voie de différenciation mâle pendant la vie fœtale se fait en plusieurs étapes : l'arrêt mitotique (entrée en quiescence), la perte des marqueurs de pluripotence et l'acquisition de nouvelles marques épigénétiques.

Chez la souris, les gonocytes vont progressivement ralentir leur prolifération à partir de 12,5 jpc puis rapidement s'arrêter en G1/G0 (Vergouwen et al., 1991). A 14,5 jpc, plus de 90% des gonocytes sont quiescents (Trautmann et al., 2008; Western et al., 2011). Au moins deux mécanismes régulent cette étape d'arrêt mitotique :

- Le premier consiste à réguler le point de contrôle G1/S *via* la régulation de l'état de phosphorylation de la protéine Retinoblastoma 1 (Rb1). *Rb1* est historiquement le premier gène suppresseur de tumeur découvert. Il régule et inhibe le cycle cellulaire. En effet, sous forme hypophosphorylée, RB1 se fixe au facteur de transcription E2F et empêche la transcription, par ce dernier, de gènes du cycle cellulaire tels que *Cycline E* et *A, Cyclin-dependent kinase 2* (*Cdk2*) mais aussi de gènes impliqués dans les étapes précoces de la réplication de l'ADN comme *Cell division cycle 6* (*Cdc6*) et de gènes codants pour les protéines du complexe MCM (Minichromosome maintenance complex*)*.

- Le deuxième mécanisme est l'expression progressive à partir de 12,5 jpc par les prospermatogonies d'inhibiteurs du cycle cellulaire dont les membres de la famille INK4 (p15 et p16) et de la famille CIP/KIP (p21, 27 et 57) qui inhibent soit l'action des cdk/cyclines soit

la formation des complexes cdk/cyclines (Beumer et al., 1999; Western et al., 2008). Des signaux paracrines extracellulaires venant de l'environnement somatique régulent également l'entrée en quiescence des CG comme par exemple l'Activine sécrétée par les cellules de Leydig fœtales qui inhibe la prolifération des CG (Archambeault and Yao, 2010).

Pendant la période de quiescence, les CG subissent d'importants remaniements épigénétiques dont la méthylation des gènes soumis à empreinte paternelle. Cette méthylation, dite *de novo*, se met en place à partir de 14,5 jpc et se termine à la naissance. L'apposition de groupement méthyl sur les cytosines de l'ADN des gènes soumis à empreinte est catalysée par les DNA methyltransferase 3 (DNMT3a, b et L) dont l'expression augmente à partir de 14,5 jpc (Kato et al., 2007). La méthylation de novo n'a pas lieu chez les souris *Dnmt3L*$^{-/-}$ ce qui montre que *Dnmt3L* est, entre-autres, nécessaire à l'apposition de l'empreinte paternelle dans les CG (Bourc'his and Bestor, 2004).

Chez l'Homme, l'entrée en quiescence des CG fait débat car il n'est pas observé de phase d'arrêt mitotique synchrone. L'expression de marqueurs de pluripotence décroît pendant la vie fœtale de manière asynchrone. Il est décrit un arrêt de prolifération mis en évidence par l'absence du marqueur de prolifération PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) qui marque toutes les cellules répliquant ou réparant l'ADN dans des fœtus au deuxième trimestre de gestation (Gaskell et al., 2004). Cependant, une autre étude retrouve un marquage positif pour l'anticorps Ki67, marqueur de toutes les phases du cycle cellulaire excepté la phase G0, dans des CG de fœtus humain jusqu'à plus de 30 sg (Pauls et al., 2006). La question n'est actuellement pas clairement élucidée mais il semblerait que le testicule fœtal humain soit composé d'un ensemble hétérogène de cellules germinales. Il est possible qu'en raison du développement plus lent de l'organe et son volume plus important que chez le rongeur, des signaux diffusibles ne dictent pas l'entrée en quiescence des CG de façon synchrone. A un temps donné on peut trouver dans l'organe à la fois des gonocytes en prolifération et d'autres en quiescence mais toutes les CG passeront au cours de leur différenciation par une période de quiescence.

3.2.3.5.2 Engagement dans la gamétogénèse femelle

Chez la souris femelle, le critère principal d'engagement dans la voie de l'ovogénèse est l'entrée en méiose des CG à 13,5 jpc (Byskov, 1986). C'est le premier événement visible dans l'ovaire mais il n'est pas établi à l'heure actuelle si l'entrée en méiose des CG et la différenciation ovarienne sont des évènements liés ou distincts. L'entrée en méiose est hautement synchronisée et suit un axe rostro-caudal. L'expression transitoire du gène *Stimulated par retinoic acid 8* (*Stra8*) à partir de 12,5 jpc précède l'expression de marqueurs méiotiques et suit ce même axe antéropostérieur (Menke et al., 2003). La quasi-totalité des ovogonies initient la première division de méiose entre 13,5 et 15,5 jpc (Trautmann et al., 2008). L'aspect des CG change, elles prennent le terme d'ovocyte. Histologiquement, les CG qui ont initié la méiose sont reconnaissables par leur grande taille et l'aspect de leur chromatine filamenteuse et condensée caractéristique des stades leptotène, zygotène, pachytène et diplotène de prophase de première division méiotique que nous détaillerons paragraphe 3.2.4. Les CG s'arrêtent en diplotène de prophase I autour de la naissance (Speed, 1982).

Dans l'ovaire humain, les toutes premières CG entrent en méiose autour de la 10ème semaine de gestation pour former des ovocytes dans la partie interne du cortex (Gondos et al., 1986). L'entrée en méiose va se déclencher progressivement des parties profondes vers la superficie du cortex. Vers 12 sg, moins de 20% des CG ont initié la méiose, alors que presque la moitié des CG sont en méiose à 15 sg (données personnelles). Contrairement à la souris où toutes les CG entrent en méiose 2 jours après leur arrivée dans la gonade, chez l'Homme, la grande majorité des gonocytes continue de proliférer entre 6 et 14 sg. Les CG entrent en méiose de manière asynchrone à partir de la 10ème semaine de gestation et l'on observe, au sein d'un même nid ovigère, des CG mitotiques à différents stades de la prophase I de méiose. Les premiers stades diplotène sont observés vers 15-16 sg. Peu de données son disponibles sur cette période chez l'Homme et les mécanismes impliqués sont la plupart du temps extrapolés des données obtenues chez la souris. Cependant, puisqu'il faut 2 jours au CG murines pour se préparer à la méiose et moins d'une semaine pour parcourir la prophase de première division méiotique alors qu'il faut plusieurs semaines à mois aux CG humaines pour effectuer les mêmes étapes, peut-on être certains de la conservation des mécanismes entre les espèces ? Certains mécanismes peuvent agir différemment, être perdus, d'autres venir se surajouter.

Ainsi, les CG, initialement indifférenciées lorsqu'elles colonisent la gonade, vont s'engager, pendant la vie fœtale, dans une voie de différenciation mâle ou femelle en fonction de l'environnement somatique gonadique. Si elles s'engagent dans la voie mâle, les CG vont proliférer puis entrer en quiescence et subir une reprogrammation épigénétique. L'engagement dans la voie femelle va permettre, après une phase de prolifération, l'entrée en méiose des CG pour former des ovocytes pendant la période fœtale (Figure 18). Mais quels sont les mécanismes permettant cette dichotomie ?

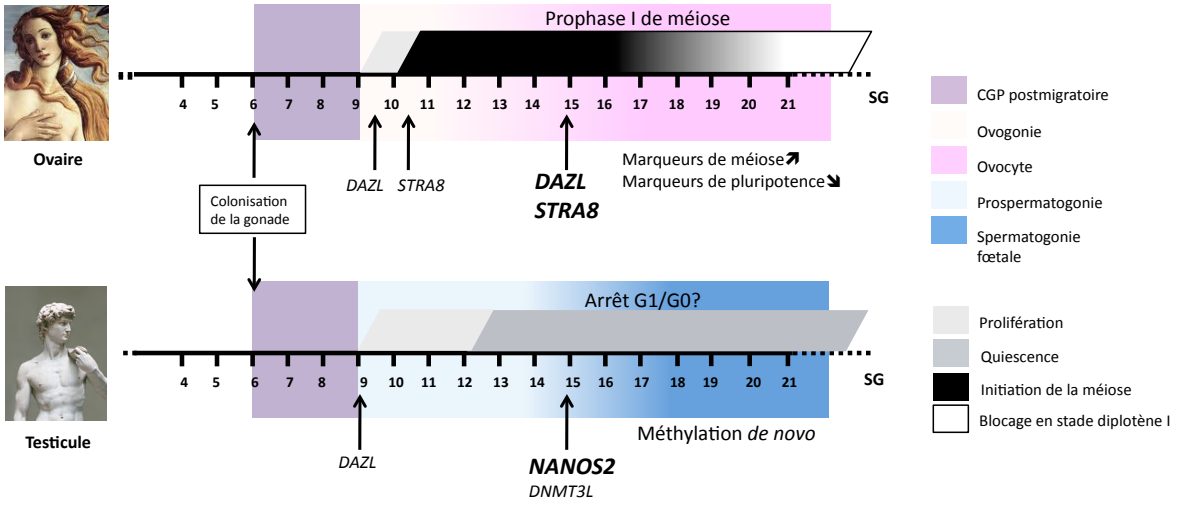


FIGURE 18 : Représentation schématique des étapes de différenciation des CG dans les gonades humaines
D'après (Anderson et al., 2007; Kerr et al., 2008a; Kerr et al., 2008b)

3.2.3.6 Transition mitose/méiose : les mécanismes moléculaires

Chez l'Homme, les données disponibles sont principalement histologiques. Elles décrivent des gonocytes d'aspect histologique identique que leur localisation soit mâle ou femelle jusqu'au moment où les CG entrent en méiose dans l'ovaire et changent d'aspect. Mais il est difficile de savoir à l'heure actuelle si ces cellules sont déjà engagées irréversiblement d'un point de vue moléculaire vers un destin sexuel mâle ou femelle. De plus, même si la voie femelle permet l'entrée en méiose des CG très tôt au cours du développement, il est important de souligner le fait que cet événement n'est pas spécifique de la voie femelle et aura lieu également dans le testicule à l'âge adulte.

Des signaux de l'environnement somatique et une réceptivité des CG sont nécessaires au bon déroulement de la différenciation des gonocytes. Ces mécanismes ont fait l'objet de nombreuses études chez la souris mais font encore débat. Chez l'Homme, ces mécanismes sont très peu décrits, notamment dans l'ovaire fœtal. Nous exposerons dans cette partie le rôle des différents acteurs connus chez la souris dans le contrôle de la transition mitose/méiose des CG.

3.2.3.6.1 Les théories historiques

L'observation chez la souris de la différenciation des CGP XY de localisation extra-gonadique suite à un défaut de migration a permis de constater que ces CG mâles retrouvées au niveau du mésonéphros, de la glande surrénale ou des poumons entraient en méiose autour de 13,5 jpc, moment de la différenciation des CG femelles dans l'ovaire (Upadhyay and Zamboni, 1982; Zamboni and Upadhyay, 1983; McLaren, 1984; Francavilla and Zamboni, 1985). Cette observation a conduit les chercheurs à penser que les CG étaient programmées pour entrer spontanément en méiose et qu'il devait exister des signaux inhibiteurs de cette entrée spontanée en méiose chez le mâle. D'autres expériences *in vitro* sont venues alimenter ce dogme. En effet, sorties de leur contexte somatique gonadique, les CG entrent en méiose en même temps qu'elles soient XX ou XY. C'est le cas par exemple de cellules fœtales XX ou XY purifiées à un stade indifférencié et placées soit dans un agrégat de cellules somatiques pulmonaires (McLaren and Southee, 1997) soit en culture sur un tapis de cellules nourricières de type fibroblastique (Nakatsuji and Chuma, 2001; Farini et al., 2005).

Cette hypothèse d'une entrée spontanée en méiose des CG dans la voie de différenciation femelle implique l'existence d'un signal testiculaire inhibiteur de l'entrée en méiose dans les cellules germinales XY. Dès 1976, l'existence d'un tel facteur a été proposé et nommé « meiotic-preventing substance » (MPS). L'existence du MPS a été suspectée au travers d'expériences de co-culture d'ovaires et testicules fœtaux chez la souris à 11,0 14,0 jpc (Byskov and Saxen, 1976). Dans ces expériences, la présence de testicules fœtaux retardait la progression méiotique des CG femelles dans l'ovaire fœtal. Un facteur testiculaire diffusible pourrait être responsable de l'inhibition de l'entrée en méiose des CG mâles dans le testicule. Plus tard, l'équipe de M. De Felici confirme, par des expériences de dissociation d'ovaires murins de 13,5 jpc et réassociation avec des cellules testiculaires fœtales de 13,5 ou 14,5 jpc, non seulement la capacité du testicule à retarder la progression méiotique des CG femelles

mais aussi à inhiber l'entrée en méiose à des âges plus précoces (Dolci and De Felici, 1990). Cette observation a été renforcée par le fait que des CG indifférenciées XX réassociées avec des cellules somatiques testiculaires fœtales n'entrent pas en méiose et présentent des caractéristiques cytologiques de CG mâles quiescentes. Il semblerait donc que le facteur testiculaire fœtal: le MPS, puisse inhiber la méiose des CG encore indifférenciées mais aussi induire leur différenciation vers la voie mâle (Adams and McLaren, 2002). La fenêtre temporelle d'action de cette inhibiteur dans les testicules se situe entre 12,5 jpc à 8 jpp (Guerquin et al., 2010).

L'hypothèse complémentaire de l'existence d'un facteur pouvant stimuler l'entrée en méiose a été proposée dès 1976. Par leurs expériences de co-culture, Byskov et Saxen suspectent une substance diffusible du tractus urogénital capable d'induire la méiose et la nomme « meiosis-inducing substance » (MIS).

Lorsque l'hypothèse du rôle de la voie de biosynthèse/dégradation de l'acide rétinoïque (AR) a été avancée, les substances MIS et MPF restaient non identifiées. Cette hypothèse réconciliait alors les deux théories : l'AR comme facteur MIS pour induire l'initiation de la méiose et l'enzyme de dégradation de l'AR, CYP26B1 (Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1), comme facteur MPF pour dégrader le MIS dans le testicule et prévenir de l'entrée en méiose. Pourtant, la démonstration formelle de la voie de l'AR comme unique acteur nécessaire n'a pas été avancée. Il reste de plus à montrer si cette hypothèse avancée chez la souris est conservée chez l'Homme et si les mécanismes sont totalement identiques. Chez l'Homme, peu de données sont disponibles mais la présence de CG à différents stades de différenciation laisse penser que les facteurs MIS et MPF pourraient coexister au sein de l'ovaire fœtal en développement.

3.2.3.6.2. L'acide rétinoïque, Stimulated by retinoic acid 8 (Stra8) et Cyp26b1

Métabolisme général de l'acide rétinoïque

Les rétinoïdes dérivent de la vitamine A (rétinol). Leur implication dans la régulation des grandes fonctions physiologiques (vision, croissance du tissu osseux, immunité…) est décrite depuis longtemps (pour revue Blomhoff, 1994). Les rétinoïdes dont l'AR, sont synthétisés à partir du rétinol apporté par l'alimentation et stocké dans le foie. Dans la cellule, le rétinol va

être métabolisé en rétinal par la Retinol déshydrogénase (ROLDH), puis en acide rétinoïque (acide rétinoïque tout-*trans* (T-RA) et 9-*cis* (9C-RA)) principalement par les *Retinaldéhyde déshydrogénase* (RALDH1, 2, 3 et 4 également nommées ALDH1A1, A2, A3). L'AR peut se lier à des récepteurs nucléaires pour moduler l'expression de certains gènes cibles par liaison à des séquences spécifiques de l'ADN, les *retinoic acid response element* (RAREs) et les *retinoid X response element* (RXREs). L'AR module l'action de certains facteurs de croissance et de leurs récepteurs avec pour conséquence une effet prolifératif ou inhibiteur de la croissance selon le type cellulaire (Earp et al., 1986). Les trois récepteurs Retinoic acid receptors (RARa, ß et g) lient les formes T-RA et 9C-RA alors que les trois récepteurs Retinoid X receptors (RXRa, ß et g) ne lient que la forme 9C-RA (pour revue Chambon, 1994). L'acide rétinoïque est ensuite rapidement catabolisé par des enzymes de la famille du Cytochrome P450, family 26 (CYP26) dont trois membres ont été identifiés comme dégradant l'AR : CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1. Le trafic intracellulaire des rétinoïdes est assuré par les Cellular rétinol binding protein (CRBPI, II et III) et les Cellular RA-binding protein (CRABPI et II).

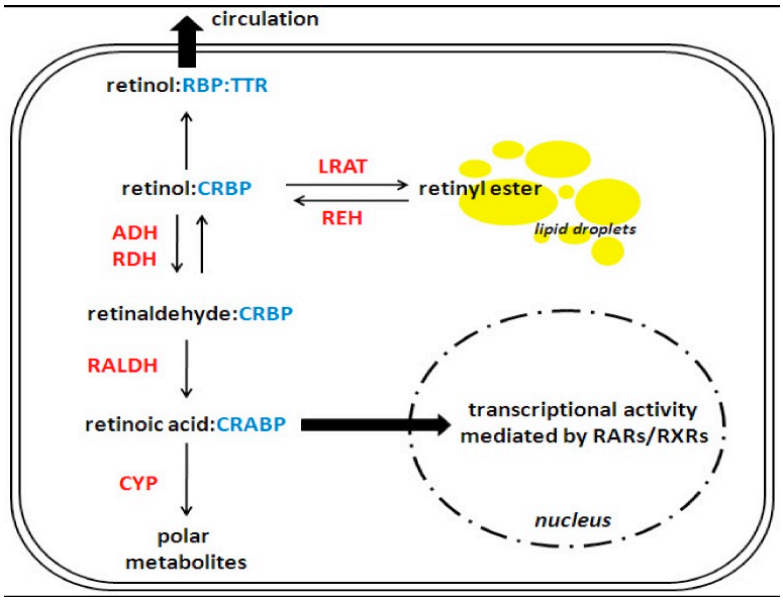


FIGURE 19 : Métabolisme de l'acide rétinoïque

Le rétinol est amené à la cellule par la Retinol binding protein (RBP). Dans la cellule, il est pris en charge par la cellular binding protein 1 (CRBP). Le stockage sous forme d'ester de rétinyl est régulé par l'action de la lécithine-rétinol acetyltransférase (LRAT) et la rétinol-ester hydrolase (REH). Le rétinol est métabolisé en rétinal par la rétinol déshydrogénase (RDH ou ROLDH), métabolisé ensuite en acide rétinoïque (AR) par la rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH) ou pris en charge par la CRBP. La cellular retinoic acid binding protein (CRABP) prend l'AR en charge au sein de la cellule. L'AR est métabolisé ou agit sur les séquences cibles de l'ADN, RAR et RXR (Clugston and Blaner, 2012).

Travaux préliminaires

Le rôle de l'AR dans l'initiation de la méiose est suspecté depuis longtemps. Il avait été observé que les rétinoïdes étaient requis pour maintenir les fonctions de reproduction mâle chez le vertébré. Un déficit en rétinoïdes affectait la spermatogénèse et le maintien de la structure du testicule (Howell et al., 1963; Thompson et al., 1964). Plus tard, il a été observé un défaut de spermatogénèse chez les souris carencées en vitamine A, réversible par gavage de ces souris par l'acide rétinoïque (Gaemers et al., 1998; van Pelt and de Rooij, 1991).

Parallèlement le gène *Stra8* qui code pour une protéine cytoplasmique en réponse au signal AR est découvert. Le gène a été nommé *Stra8* du fait que l'acide rétinoïque (AR) induit, *in vitro,* son expression dans les lignées de cellules de carcinome embryonnaire et dans les cellules souches (Oulad-Abdelghani et al., 1996). L'équipe de Pierre Chambon le décrit en 1995 et suspecte déjà un rôle de *Stra8* dans les gonades. Son expression est retrouvée exclusivement chez le mâle à l'âge adulte et localisée dans les tubules séminifères (Bouillet et al., 1995; Oulad-Abdelghani et al., 1996).

L'établissement d'un dogme

Il faut attendre 2006 pour que deux travaux concomitants montrent

i) que l'AR est produit en vie fœtale dès 10,5 jpc par l'*Aldh1a2* du mésonéphros adjacent et diffuse dans les gonades des deux sexes.

ii) que les cellules germinales fœtales expriment *Stra8* avant d'entrer en méiose et que les prospermatogonies fœtales n'expriment pas *Stra8.*

iii) les cellules somatiques du testicule fœtal produisent CYP26B1, enzyme capable de dégrader l'AR et que l'expression de *Cyp26b1* n'est pas retrouvée dans l'ovaire (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006).

L'invalidation de *Stra8* prévient l'entrée en méiose dans l'ovaire fœtal et l'ajout d'AR exogène induit l'expression de *Stra8* et l'initiation de la méiose des cellules germinales dans le testicule fœtal. De plus, l'invalidation de *Cyp26b1* dans le testicule fœtal empêcherait la dégradation de l'AR qui stimulerait *Stra8* et induirait la méiose dans les prospermatogonies. Par ces expériences, les équipes de D. Page et P. Koopman bouleversent la discipline en

proposant la voie de l'acide rétinoïque comme responsable de la dichotomie ovogénèse/spermatogénèse : l'AR jouerait le rôle du MIS et CYP26B1 le rôle du MPS (Figure 20). Chez la souris, *Cyp26b1* est initialement exprimé par les cellules somatiques des gonades indifférenciées des deux sexes. Son expression diminue rapidement dans l'ovaire et n'est plus détectable à partir de 12,5 jpc. Dans les testicules fœtaux, les cellules de Sertoli l'expriment fortement à partir de 11,5 jpc mais n'est pas retrouvé dans l'ovaire fœtal (Koubova et al., 2006; Guerquin et al., 2010). Cette enzyme empêcherait la méiose dans le testicule fœtal en dégradant l'AR produit par le mésonéphros adjacent. En effet, l'expression de *Cyp26b1* serait stimulée par les facteurs pro-testiculaires SOX9 et SF1 et inhibée par le facteur pro-ovarien FOXL2 (Kashimada et al., 2011b). Son invalidation dans le testicule fœtal de souris transgéniques entraîne l'augmentation de la concentration en AR, de l'expression de *Stra8* et permet la méiose (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). L'utilisation *in vitro* d'antagonistes des CYP confirme les effets sur le testicule fœtal observés lors de l'invalidation *in vivo* de *Cyp26b1* suggérant que les CG entrent en méiose suite à un signal AR (Bowles et al., 2006; MacLean et al., 2007; Trautmann et al., 2008) (Figure 20). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs RAR *in vitro* dans des ovaires bloque la signalisation de l'AR et l'expression de *Stra8*. Les ovogonies n'entrent pas en méiose (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006) (Figure 20). De manière similaire, l'inhibition des ALDH, et donc de la synthèse d'AR par un inhibiteur de ces enzymes, prévient l'entrée en méiose des CG dans l'ovaire fœtal (Le Bouffant et al., 2010) (Figure 20).

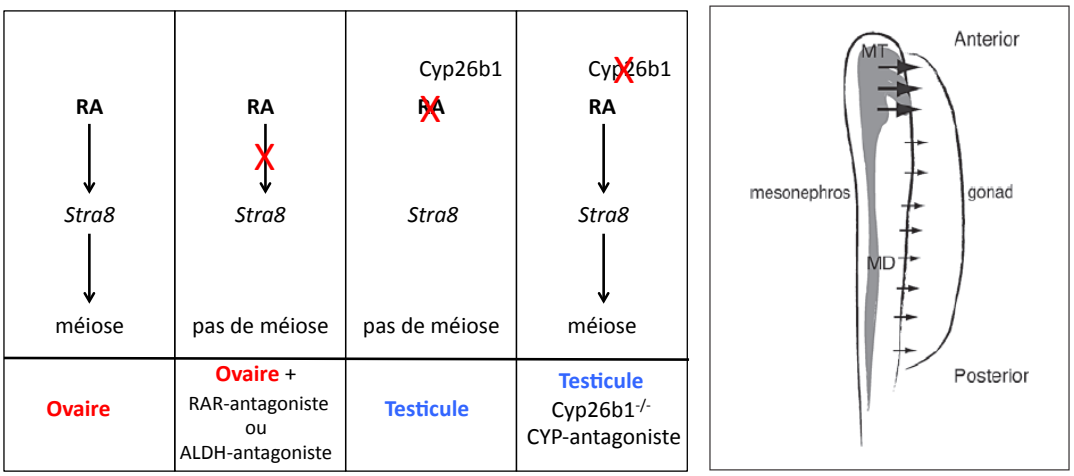


FIGURE 20 : Représentation schématique de l'initiation de la méiose par la voie de l'AR
La figure de gauche schématise le rôle de la voie de l'AR dans les ovaires et testicules fœtaux de souris sauvages ou en conditions expérimentales (KO Cyp26b1 ou antagonistes de la voie de l'AR). La partie de gauche illustre la théorie de la production de l'AR par le mésonéphros adjacent qui diffuse de la partie antérieure à la partie postérieure de la gonade et responsable de la vague antéro-postérieure d'entrée des CG en méiose dans l'ovaire fœtal murin (Koubova et al., 2006; Le Bouffant et al., 2010; Bowles and Koopman, 2013).

Rôle de Stra8

Depuis, ces travaux ont été largement confirmés. *Stra8* est utilisé comme marqueur de l'entrée en méiose dans toutes les études portant sur la différenciation sexuelle des CG et est considéré comme le « gardien de l'entrée en méiose ». A notre connaissance, il n'existe pas de modèle d'étude dans lequel la méiose est initiée sans l'expression de *Stra8*.

La fonction moléculaire de *Stra8* est très peu décrite. Le gène code pour une protéine nucléo-cytoplasmique (Tedesco et al., 2009) qui serait capable de se lier à la chromatine et d'activer la transcription. Mais ce rôle n'a pas été démontré. Dans l'ovaire fœtal, l'expression de *Stra8* augmente à partir de 12,5 jpc pour atteindre un maximum à 14,5 jpc puis diminuer. Cette fenêtre d'expression correspond à la période d'initiation de la méiose dans l'ovaire. *Stra8* est nécessaire à la transition mitose/méiose puisque l'ajout d'AR n'est pas suffisant pour induire l'initiation de la méiose dans les ovaires des souris *Stra8*$^{-/-}$ (Koubova et al., 2006).Cependant, l'expression de *Stra8* n'est possible que si les CG sont compétentes et prêtes à entrer en méiose. En effet, l'ajout d'AR n'est pas suffisante pour induire l'expression de *Stra8* dans les testicules des souris *Dazl*$^{-/-}$ (Lin et al., 2008). Stra8 ne semble pas non plus suffisant pour l'initiation de la méiose puisque l'exposition à l'AR de testicules fœtaux à 13,5 jpc induit l'expression de *Stra8* mais les CG n'entrent pas en méiose (Trautmann et al., 2008).

L'initiation du programme méiotique dépendrait de l'expression de *Stra8*. *Stra8* n'intervient pas dans la réplication de l'ADN dans les ovogonies mitotiques mais serait requis pour la réplication pré-méiotique. Il interviendrait également dans les grandes étapes de la prophase I méiotique (condensation des chromosomes, cohésion, synapsis et recombinaison que nous détaillerons plus loin). Ce rôle a été décrit initialement chez la femelle (Baltus et al., 2006) puis chez le mâle (Anderson et al., 2008). De manière intéressante, une récente étude confirme ce rôle de *STRA8* dans les ovogonies mais dissocie l'entrée en méiose des ovogonies et la différenciation sexuelle morphologique des ovogonies en ovocytes. En effet, les femelles *Stra8*$^{-/-}$ sont stériles mais leurs ovaires contiennent des « ovocytes-like » pourvus d'une zone pellucide et de cellules folliculaires et ovulés sous stimulation hormonale. Cependant, la méiose ne s'est pas déroulée correctement puisqu'il n'y a pas eu de réplication ni de recombinaison, ce qui peut expliquer la stérilité des souris (Dokshin et al., 2013). La différenciation cellulaire de l'ovogonie en ovocyte serait donc indépendante de l'entrée en méiose de la cellule même si les deux évènements sont nécessaires pour la compétence finale des gamètes. Enfin, l'AR semble agir également indépendamment de *Stra8* puisque lors de la

double invalidation *Cyp26b1*/*Stra8*, les prospermatogonies n'entrent plus en méiose en vie fœtale du fait de l'absence de *Stra8* mais le programme de différenciation mâle (*Nanos2*, *Dnmt3L*) n'est récupéré que dans la moitié des CG (Saba et al., 2014b).

Le débat actuel

La voie de l'AR a été remise en cause par la suite. En effet,

i) L'apport d'AR exogène *in vitro* induit les mêmes effets que ceux observés chez la souris *Cyp26b1*$^{-/-}$ alors qu'il est ajouté à de fortes doses non physiologiques.

ii) Rôle non suffisant de l'AR car les CG meurent rapidement par apoptose chez les souris *Cyp26b1*$^{-/-}$ (MacLean et al., 2007) et l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose est possible en l'absence de production d'AR (souris invalidées pour *Raldh2* et *3*) (Kumar et al., 2012)

iii) il n'existe pas de preuve définitive du rôle de l'AR dans l'initiation méiotique

Il est possible de forcer l'entrée en méiose *in vitro* des CG fœtales XY par la surexpression de *Stra8* induite par d'importantes doses d'AR en dépit de l'expression de *Cyp26b1* (Trautmann et al., 2008; Bowles et al., 2010; Guerquin et al., 2010). Cependant, les doses non physiologiques d'AR pourraient induire d'autres mécanismes indépendants de l'expression de *Stra8* et responsables des effets observés.

De plus, il a été observé que les CG entrent en méiose mais disparaissent rapidement par apoptose chez les souris *Cyp26b1*$^{-/-}$ (MacLean et al., 2007). Un niveau d'expression bas de l'AR *via* l'expression de *Cyp26b1* dans le testicule fœtal empêcherait physiologiquement l'entrée en méiose des CG ainsi que l'apoptose de ces cellules. Dans l'ovaire fœtal, l'AR devrait logiquement induire la méiose mais également une importante apoptose des CG. Même si de nombreux ovocytes n'atteindront jamais le stade diplotène de prophase I, les taux d'apoptose observés chez la femelle sont bien inférieurs à ceux obtenus chez le mutant *Cyp26b1* dans le testicule fœtal. On peut donc supposer qu'en l'absence de dégradation de l'AR chez le mâle, les CG entrent en méiose mais que celle-ci ne se déroule pas normalement. Il existerait donc des facteurs complémentaires nécessaires au déroulement correct de l'entrée en méiose et de la progression méiotique. Le mésonéphros a été proposé comme organe-clé dans la transition mitose/méiose en produisant l'acide rétinoïque qui diffuse ensuite dans la

gonade. L'ALDH1A2/RALDH2 y est produite dès 10,5 jpc chez la souris (Bowles et al., 2006). Ce modèle est contesté par l'étude des gonades fœtales chez les mutants murins invalidés pour *Raldh2* ou *Raldh2/Raldh3* (Kumar et al., 2012). Dans ces modèles génétiques, le taux d'AR dans les gonades et le mésonéphros est indétectable. Pourtant, l'expression de *Stra8* est retrouvée dans les ovaires. Les ovogonies entrent en méiose suggérant que l'AR ne serait nécessaire ni à l'expression de *Stra8* ni au déclenchement de la méiose. Il manque cependant à ce modèle l'invalidation de l'*Aldha1/Raldh1* pourtant décrite comme étant l'enzyme de la famille des RALDH principalement active pour la synthèse d'AR dans l'ovaire (Mu et al., 2013). L'ALDH1A1 pourrait produire de l'AR très localement dans l'entourage des CG et de très faibles doses sont peut-être suffisantes pour stimuler au niveau cellulaire l'expression de *Stra8* dans les CG sans que l'AR produit ne soit dosable dans les organes. Dans les expériences de Kumar et col., l'ajout *in vitro* d'un inhibiteur des CYP sur les testicules fœtaux de souris déficientes pour la production d'AR entrainait l'expression de *Stra8*. La même expérience réalisée en cultivant les gonades sans mésonéphros ne stimulait pas l'expression de *Stra8* (Kumar et al., 2012). Ces résultats suggèrent que CYP26B1 inhiberait l'expression de *Stra8* dans le testicule fœtal par une autre voie que celle de l'AR et qu'une autre substance que l'AR produite par le mésonéphros et sensible à CY26B1 serait capable de stimuler *Stra8*. Des données contradictoires retrouvent que dans des ovaires fœtaux cultivés *in vitro* sans le mésonéphros, les CG expriment *Stra8* et entrent en méiose, laissant supposer que le mésonéphros n'est pas la source du facteur déclenchant la méiose (Guerquin et al., 2010; Mu et al., 2013) (Résumé en Figure 21).

Même si la voie de l'AR semble impliquée dans l'entrée en méiose des cellules germinales, il n'en existe pas actuellement de preuve formelle. Il faudrait pour cela générer des lignées de souris invalidées pour les trois *Aldh* (*Aldh1a1*, *1a2* et *1a3*) ou réaliser une invalidation conditionnelle des trois *Rar* spécifiquement dans les CG pour observer les effets d'une inhibition totale de la voie de l'AR dans les CG.

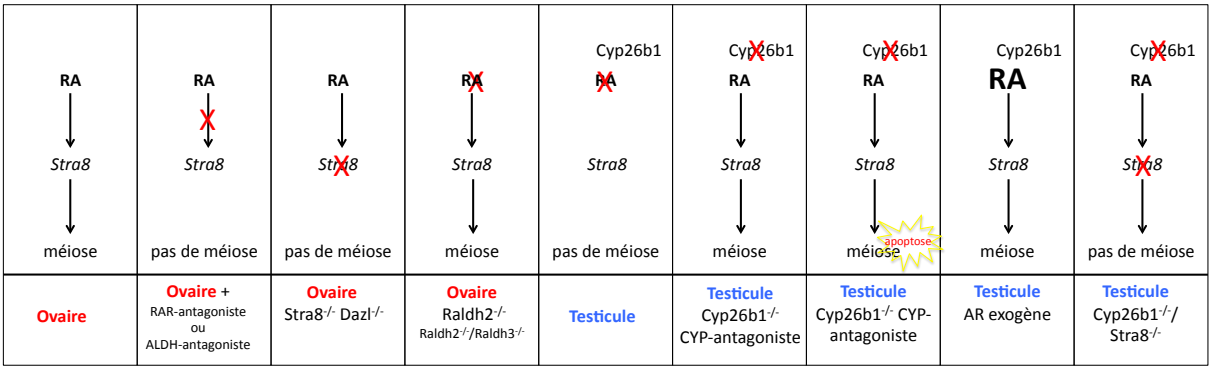


FIGURE 21 : Schéma récapitulatif du rôle de la voie des rétinoïdes dans la transition mitose/méiose

D'après (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006; MacLean et al., 2007; Le Bouffant et al., 2010; Kumar et al., 2012; Saba et al., 2014b)

L'ensemble de ces données montre à quel point le rôle de l'AR, de *Stra8* et de *Cyp26b1* dans l'initiation de la méiose est encore mal connu et sujet à de vifs débats. Il semblerait que la transition mitose/méiose ne soit possible que dans des cellules compétentes pour. Le rôle exact de *Stra8* dans l'initiation et la progression méiotique reste inconnu et des mécanismes additionnels à Stra8 et l'AR existent très probablement pour contrôler l'initiation de la méiose des ovogonies et prévenir de la méiose dans les prospermatogonies. Ces facteurs sont encore largement mal connus chez la souris mais certains ont été proposés et vont être exposés maintenant.

3.2.3.6.3 Autres facteurs

Une seule autre voie canonique de signalisation que celle de l'AR a été proposée pour stimuler l'entrée des ovogonies en méiose : la voie RSPO1/WNT4/βCAT. Cette voie a été présentée précédemment pour son rôle dans la différenciation somatique ovarienne. Il a été montré lors de l'invalidation complète de *Rspo1*, que la proportion de CG exprimant des marqueurs méiotiques dans des ovaires murins diminue significativement alors que l'invalidation de cette voie spécifiquement dans les cellules somatiques ovariennes ne modifie pas l'initiation de la méiose. La voie RSPO1/WNT4/βCAT pourrait agir directement sur les ovogonies pour stimuler la méiose. Cependant, la surexpression de cette voie dans des testicules fœtaux n'est pas suffisante pour faire entrer les prospermatogonies en méiose (Chassot et al., 2011).

Le facteur DMRT1, présenté précédemment pour son rôle dans l'entrée en quiescence des spermatogonies et du maintien du phénotype testiculaire, est capable de se lier au promoteur de *Stra8*. Dans les ovaires fœtaux des souris *Dmrt1*$^{-/-}$, le nombre de CG exprimant *Stra8* est diminué induisant des défauts de mise en place de la prophase I de méiose. Malgré tout, DMRT1 n'est pas suffisant puisque les femelles *Dmrt1*$^{-/-}$ sont fertiles même si elles présentent un nombre réduit de follicules (Krentz et al., 2011).

Les gènes *Muscle-segment homeobox* (*Msx*) sont des facteurs de transcription à homéodomaine. Il en existe trois chez la souris : *Msx 1* (*Hox7*), *Msx2* (*Hox8*) et *Msx3*. Chez l'Homme, on compte seulement deux membres de la famille des *MSX* : *MSX1* (*HOX7*) et *MSX2* (*HOX8*). Les gènes Msx sont principalement régulés par les BMP et les WNT (Ramos and Robert, 2005). Ces deux facteurs sont exprimés différentiellement dans les gonades murines avec une expression plus forte dans les ovaires fœtaux. De plus, Msx1 et Msx2 sont spécifiquement exprimés dans les ovogonies au cours du développement ovarien fœtal. La double invalidation *Msx1/Msx2* entraîne une diminution du niveau d'expression de *Stra8* dans les ovaires fœtaux et une réduction du nombre de CG méiotiques (Le Bouffant et al., 2011). Ces données proposent un rôle des gènes à homéodomaine dans la régulation de la transition mitose/méiose.

Ces différentes études proposent un rôle de *Dmrt1*, de la βcaténine et des *Msx* dans la régulation de l'entrée en méiose de CG. L'expression adéquate de *Stra8* dépendrait de l'expression en amont d'un cocktail de facteurs dont ceux cités précédemment. La recherche d'autres acteurs non décrits à ce jour et la régulation des différents facteurs entre eux et de leur action sur Stra8 doit être explorée.

La co-culture d'ovaires fœtaux indifférenciés avec des testicules fœtaux inhibe l'entrée en méiose des ovogonies (Guerquin et al., 2010). Cette expérience met en évidence que le testicule sécrète dans le milieu de culture des molécules inhibitrices diffusibles capables d'inhiber l'entrée en méiose dans l'ovaire en culture. De la même manière, l'inhibition du transport protéique par la Brefeldin A dans des testicules fœtaux induit l'entrée en méiose des prospermatogonies (Best et al., 2008). Ces données suggèrent que les différentes cellules composant le testicule vont secréter des facteurs inhibiteurs de la méiose qui agiraient comme substances MPS.

Le FGF9, décrit précédemment dans la différenciation somatique testiculaire, a été proposé comme facteur diffusible préventif de l'entrée en méiose des CG (Barrios et al., 2010; Bowles

et al., 2010). Chez la souris, le FGF9 est sécrété par les cellules de Sertoli du testicule fœtal et les CG expriment le récepteur aux FGFs. L'expression de *Stra8* et la méiose sont significativement diminuées dans des ovaires fœtaux cultivés en présence de FGF9, et ce, sans modification de l'expression de *Cyp26b1*. Dans les testicules *Cyp26b1*$^{-/-}$ (donc dans lesquels *Stra8* est exprimé) cultivés *in vitro*, l'inhibition de la voie du FGF potentialise significativement l'expression de *Stra8* en comparaison à l'inhibition de *Cyp26b1* seule. Le même résultat est obtenu, *in vivo*, grâce à un modèle génétique *Cyp26b1*$^{-/-}$/*Fgf9*$^{+/-}$ dans lequel *Fgf9* est moitié moins exprimé. L'expression de *Sox9* n'est pas modifiée suggérant alors que ce rôle serait indépendant d'un effet sur la différenciation sexuelle des cellules somatiques. L'ensemble des résultats met en évidence que le FGF9 agirait comme un facteur diffusible avec une activité MPS qui serait capable d'inhiber la méiose en rendant les CG moins sensibles à l'AR et antagoniserait la voie de l'AR dans le testicule fœtal (Barrios et al., 2010; Bowles et al., 2010). Cependant, le fait que les CG XY des testicules fœtaux *Cyp26b1*$^{-/-}$ expriment *Stra8* et entrent en méiose malgré un taux de FGF9 normal laisse supposer que la voie de l'AR est prédominante par rapport à la voie du FGF9 (Bowles et al., 2006; Bowles et al., 2010).

La protéine de liaison aux ARN, NANOS2, est spécifiquement exprimée dans les cellules germinales testiculaires au moment de la détermination sexuelle germinale soit à 13,5 jpc chez la souris. Il a été montré que NANOS2 pouvait lier les ARN de *Stra8* et de *Sycp3* (Barrios et al., 2010; Suzuki et al., 2010). Son implication dans l'induction de la différenciation mâle des cellules germinales a été proposée chez la souris. En effet, l'invalidation de Nanos2 induit la perte des CG par apoptose mais la double invalidation Nanos2$^{-/-}$/Bax$^{-/-}$ empêche l'apoptose des CG et permet l'expression de *Stra8* dans le testicule fœtal à partir de 14,5 jpc et l'entrée en méiose à partir de 15,5 jpc. Réciproquement, la surexpression de *Nanos2* dans l'ovaire fœtal inhibe l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose des ovogonies (Suzuki and Saga, 2008). CYP26B1 en dégradant l'acide rétinoïque dans le testicule fœtal, autoriserait l'expression de *Nanos2* qui induirait alors la différenciation mâle des cellules germinales par i) l'inhibition de *Stra8* dans les CG, ii) l'induction de la différenciation mâle et des remaniements épigénétiques spécifiques du testicule fœtal (Suzuki and Saga, 2008). Dans l'ovaire fœtal, l'AR inhiberait l'expression de *Nanos2* et induirait l'expression de *Stra8* pour autoriser l'initiation de la méiose et empêcher la différenciation testiculaire. Une étude récente a permis d'obtenir la double invalidation de *Nanos 2* et *Stra8* dans les gonades fœtales murines. L'expression de gènes spécifiques de la

différenciation mâle, inhibée lors de l'invalidation simple de *Nanos2*, est fortement restituée chez les souris doublement invalidées (Saba et al., 2014a). Ces données suggèrent que Nanos2 serait nécessaires à l'expression de gènes de la voie mâle et au maintien de la quiescence et non à l'initiation de l'entrée en quiescence. NANOS2 n'est pas seulement un acteur de la suppression de l'entrée en méiose des CG XY en vie fœtale, il joue également un rôle clé dans la différenciation des CG mâles. L'identification des facteurs agissant en amont de NANOS2 et de leurs voies de régulation permettra de mieux comprendre les mécanismes contrôlant la différenciation sexuelle de la lignée germinale.

Récemment, *Nodal* a été proposé comme acteur de la transition mitose/méiose. *Nodal* appartient à la superfamille du TGFβ, tout comme l'Activine, les BMP et l'AMH. L'inhibition *in vitro* de la voie NODAL/TGFβ dans des testicules de 11,5 jpc permettait l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose sans changement des niveaux d'expression de *Cyp26b1* et *Fgf9* (Souquet et al., 2012). Inversement, l'ajout de NODAL recombinant sur des ovaires de 11,5 jpc en culture diminuait drastiquement l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose. Ces données proposent un nouveau modèle d'induction de *Stra8* et de la méiose indépendamment de la voie de l'AR. Il est également intéressant de noter que c'est le seul modèle avec celui des souris invalidées pour *Cyp26b1* dans lequel les prospermatogonies entrent artificiellement en méiose mais dans un *timing* respectant celui des CG XX dans l'ovaire fœtal (MacLean et al., 2007; Souquet et al., 2012). *Nodal* a été proposé comme cible de FGF9 pour promouvoir le destin mâle des CG. En l'absence de Nodal, la voie de signalisation du FGF n'induit plus la différenciation germinale mâle (Wu et al., 2013).

La voie de signalisation NOTCH exposée précédemment dans l'assemblage des follicules primordiaux a été étudiée à un stade plus précoce du développement ovarien. *Notch1* est détectable dès 11,5 jpc dans les ovaires murins et son expression augmente significativement à partir de 12,5 jpc pour diminuer à partir de 14,5 jpc. L'expression de *Notch2* est détectable mais reste faible et augmente à partir de 14,5 jpc. L'inhibition *in vitro* de la voie de signalisation Notch dans des ovaires fœtaux entraîne une diminution de l'expression de *Stra8* et un retard dans la progression méiotique (Feng et al., 2014). Il est proposé, par ces expériences de cultures organotypique en présence d'AR et d'inhibiteurs de la voie Notch, ainsi que par l'inhibition spécifique par RNAi de *Notch1* dans les ovaires fœtaux, que les acteurs de la voie NOTCH acétylent le promoteur de *Stra8* dans l'ovaire, le rendant ainsi sensible au signal AR. Ces résultats suggèrent un nouveau rôle de la voie NOTCH dans

l'initiation méiotique même si plusieurs récepteurs et ligands appartiennent au système Notch et que leur potentiel rôle dans la transition mitose/méiose n'a pas été clairement établi.

3.2.3.6.4 Résumé de la détermination sexuelle des CG chez la souris

Nous venons d'exposer précédemment les différents facteurs/voies de signalisation pouvant expliquer la dichotomie ovogénèse/spermatogénèse. Le scénario exact de la différenciation sexuelle des CG dans les gonades fœtales est encore incertain et de nombreuses questions restent à l'heure actuelle en suspens. Il apparaît qu'un ensemble de facteurs seraient impliqués et que selon leur combinaison, ils feraient pencher la balance vers un destin femelle ou mâle. Parmi ces acteurs, des voies de signalisation impliquant des facteurs sécrétés comme les voies de l'AR, de WNT/RSPO1/β-CAT, du FGF9, du TGFβ ou NOTCH ont été proposées ainsi que des facteurs cellulaires tels que NANOS2, DMRT1 et les MSX (Figure 22).

Il ressort de toutes ces données que la CG doit avant tout être compétente pour la gamétogénèse. La protéine de liaison aux ARN DAZL, semble être prérequise pour que les CG s'engagent dans une voie de différenciation sexuelle. En son absence, les CG ne peuvent pas s'engager dans l'ovogénèse ou la spermatogénèse et disparaissent rapidement. Il n'est pas exclu que d'autres facteurs soient impliqués dans ce « permis de différenciation sexuelle ».

Une fois la compétence pour la gamétogénèse acquise, les CG vont être sensibles aux facteurs diffusibles ou cellulaires présentés précédemment.

Dans l'engagement vers l'ovogénèse, il semblerait que l'AR stimule l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose tout en réprimant *Nanos2* et donc l'entrée en quiescence et l'initiation du programme mâle. De la même manière, les voies WNT/RSPO1/β-CAT et NOTCH seraient capables d'induire l'expression de *Stra8* et la transition mitose/méiose et réprimer l'entrée en quiescence. Certains facteurs intrinsèques comme les Msx semblent nécessaires à la réceptivité des CG. Il est important également de bien dissocier engagement vers un destin sexuel femelle et initiation de la méiose puisqu'il a été récemment mis en évidence que des CG pouvaient s'engager dans l'ovogénèse et se différencier morphologiquement en ovocytes sans avoir initié correctement la méiose.

A l'inverse, dans le testicule fœtal, l'AR est dégradé par l'action de CYP26B1 empêchant la stimulation de l'expression de *Stra8*. FGF9 semble également avoir un rôle dans l'inhibition

de l'expression de *Stra8* et la prévention de la méiose. Le FGF9 stimulerait l'expression de *Nanos2 via* la voie du TGFβ. NANOS2 inhibe l'expression de *Stra8* et joue un rôle dans le maintien de la quiescence des CG fœtales testiculaires. La voie du TGFβ induirait la quiescence *via* l'expression de *Nanos2*, indépendamment du FGF9.

Enfin, DMRT1 semble jouer un rôle différent dans les ovogonies et les prospermatogonies. Dans l'ovaire, *Dmrt1* stimulerait l'expression de *Stra8* et la voie de différenciation femelle alors que dans le testicule, *Dmrt1* permet l'entrée en quiescence et le maintien de gènes de pluripotence.

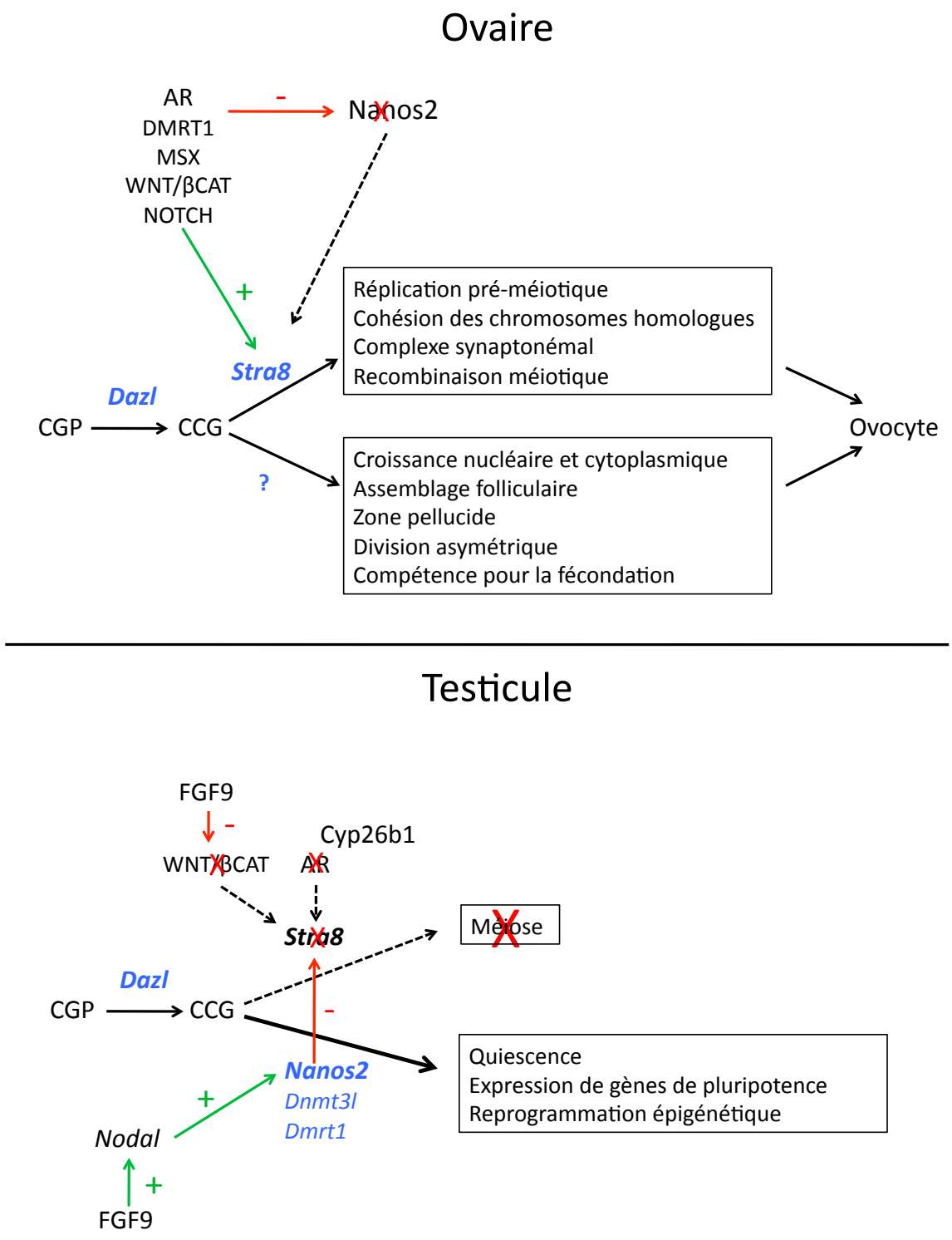


FIGURE 22 : Résumé des potentiels acteurs responsables de la dichotomie ovogénèse/spermatogénèse

CGP pour cellule germinale primordiale, CCG pour cellule compétente pour la gamétogénèse (Dokshin et al., 2013; Wu et al., 2013).

3.2.3.6.5 Données humaines, état des lieux

Chez l'Homme, peu de données sont disponibles concernant les mécanismes moléculaires contrôlant l'entrée en méiose et la différenciation des CG décrits précédemment. La voie de l'AR est très conservée entre les espèces. L'AR serait également un potentiel morphogène dont les effets variés joueraient un rôle dans la différenciation cellulaire et le développement chez l'Homme.

Le gène *STRA8* existe également chez l'Homme et est exprimé dans les gonades avec un différentiel d'expression ovaires/testicules. Pendant la période fœtale, *STRA8* est exclusivement exprimé dans les ovaires. Son expression est retrouvée à partir de 10-11 sg et augmente fortement à partir de 14-16 sg (Le Bouffant et al., 2010; Childs et al., 2011).

Il a également été montré que l'expression de *STRA8* et l'entrée en méiose étaient stimulables par l'AR dans l'ovaire fœtal humain (Le Bouffant et al., 2010). L'expression de *STRA8* et de marqueurs de méiose comme *REC8*, *SPO11* ou *DMC1* étaient très fortement augmentée dans les ovaires fœtaux cultivés en présence d'AR exogène à forte dose. En revanche, dans le testicule fœtal, de fortes doses d'AR entraînent la surexpression de *STRA8* mais sans que les CG entrent en méiose (Childs et al., 2011).

L'analyse de l'expression des gènes de la voie de l'AR dans les gonades fœtales mâles et femelles de 8 à 20 sg a permis de mettre en évidence l'expression des 3 ALDH métabolisant l'AR (*ALDH1A1*, *ALDH1A2* et *ALDH1A3)* à des niveaux d'expression plus forts que ceux observés dans le mésonéphros (Childs et al., 2011). De même, l'expression des 3 récepteurs RAR et RXR a été décrite à tous les stades de développement étudiés dans les ovaires comme dans les testicules (Childs et al., 2011). Enfin, l'enzyme de dégradation de l'AR, CYP26B1, est présente dans les testicules et dans les ovaires fœtaux (Childs et al., 2011). L'AR peut donc être synthétisé, se fixer à des récepteurs et être dégradé dans les gonades fœtales humaines. La fonctionnalité des ALDH a été testée par ajout, dans le milieu de culture, d'un inhibiteur synthétique des ALDH. L'inhibition des ALDH entrainait la diminution de l'entrée en méiose des CG dans des ovaires fœtaux humains du premier trimestre cultivés sans mésonéphros (Le Bouffant et al., 2010). La voie de synthèse et de signalisation de l'AR est donc active dans l'ovaire fœtal. De manière intéressante, le profil d'expression de l'*ALDH1A1* était corrélé à celui de *STRA8* présentant une forte augmentation à partir de 10-11 sg alors que l'*ALDH1A2* était exprimé à niveau constant à tous les stades de développement (Le Bouffant

et al., 2010). Ce profil d'expression laisse à penser que l'ALDH1A1 jouerait un rôle majoritaire dans la synthèse d'AR dans l'ovaire. Cependant, contrairement au modèle murin, l'expression de *CYP26B1* était retrouvée dans les ovaires, et à un niveau d'expression plus fort que dans les testicules fœtaux (données du laboratoire, Le Bouffant et al., 2010; Childs et al., 2011). Les différents acteurs de la voie de signalisation de l'AR sont en place dans les gonades fœtales humaines. Même si il n'existe pas de preuve formelle du rôle de l'AR dans l'entrée en méiose des CG humaines car les données reposent uniquement sur des expériences *in vitro* utilisant de fortes doses d'AR exogènes ou des inhibiteurs de synthèse, cette voie semble active chez l'Homme au moment de la transition mitose/méiose. Des différences notables observées avec le modèle murin questionnent cependant sur une conservation de la régulation du système.

Certains autres facteurs décrits comme potentiellement impliqués dans la différenciation des CG chez la souris ont été décrits chez l'Homme. C'est le cas de *NANOS2* dont l'expression augmente fortement dans le testicule à partir de 14-16 sg et reste basse dans l'ovaire (Childs et al., 2011). Le facteur de transcription DMRT1 a été retrouvé dans les cellules de Sertoli et les CG de testicules fœtaux étudiés de 10 à 24 sg. Ce facteur a également été retrouvé dans des ovaires fœtaux d'âges équivalents mais spécifiquement dans les CG (Jorgensen et al., 2012). Enfin, les facteurs de transcription *MSX1* et *MSX2* sont exprimés dans l'ovaire humain pendant toute la période fœtale avec une augmentation de l'expression autour de 14 sg, stade où l'on observe une importante entrée en méiose de CG dans l'ovaire humain. De plus, l'expression de *MSX1* et *MSX2* est potentialisée par ajout d'AR sur des ovaires fœtaux de 8 à 11 sg cultivés *in vitro* (Le Bouffant et al., 2011).

En conclusion, les rares études réalisées sur des prélèvements humains semblent retrouver des voies de signalisation actives décrites chez la souris dans la différenciation sexuelle des CG et la transition mitose/méiose. En revanche, il semblerait que ces voies de signalisation ne fonctionnent pas totalement de la même manière ou que des facteurs additionnels soient en jeu. La dichotomie ovogénèse/spermatogénèse s'explique chez la souris par l'engagement vers un destin femelle ou mâle qui s'excluent mutuellement. Chez l'Homme, la même dichotomie ovogénèse/spermatogénèse est observée mais l'expression de facteurs mâles, comme par exemple CYP26B1, est retrouvée dans l'ovaire fœtal humain. L'engagement vers l'ovogénèse ou la spermatogénèse semble se faire plus subtilement à une échelle de l'ordre d'un groupe cellulaire plutôt que de l'organe. Cette différence pourrait expliquer l'asynchronie et la coexistence de populations cellulaires à des stades variés du

développement observées chez l'Homme. La mise en place plus lente de la lignée germinale pourrait s'expliquer par la présence de mécanismes redondants chez l'Homme nécessitant une expression plus prononcée des facteurs inducteurs pour que la cellule entre en différenciation. La première piste à explorer dans l'ovaire fœtal humain pour expliquer l'échappement de certaines ovogonies à l'entrée en méiose est celle d'une régulation différente de la voie de l'AR chez l'Homme. La seconde serait d'imaginer que des voies observées dans le développement du testicule murin seraient utilisées par l'ovaire fœtal humain.

3.2.4 La méiose

3.2.4.1 Généralités

Il a été exposé précédemment que la méiose (du grec *meiôsis*, décroissance, réduction) permet la génération de cellules haploïdes à partir d'une cellule diploïde suite à deux divisions successives sans évènement de réplication de l'ADN entre ces deux divisions. La première division de méiose (méiose I) est précédée d'une phase de réplication et permet la séparation des chromosomes homologues (paternels et maternels). La deuxième division (méiose II) permet la séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. Elle ne comprend ni de phase G1 ni de phase S et sa prophase est écourtée. Ce processus contribue à la formation des gamètes : les ovocytes (femme) et les spermatozoïdes (homme) (Figure 23). Cependant l'initiation de la méiose intervient à des moments différents du développement chez la femme et chez l'homme. Chez la femme, les cellules germinales entrent en méiose pendant la vie fœtale et l'ensemble des ovocytes stoppe la progression méiotique au stade diplotène de première division. Cet état « quiescent » perdure jusqu'à la puberté, moment à partir duquel plusieurs follicules entreront en croissance cycliquement. A chaque cycle, un seul atteindra le stade préovulatoire au sein duquel l'ovocyte va reprendre son cycle de division. La première division de méiose se termine par l'expulsion du premier globule polaire, reliquat cellulaire contenant la moitié des chromosomes. En l'absence de fécondation, l'ovocyte bloqué en métaphase de deuxième division de méiose dégénère. Si l'ovocyte est fécondé, il finira la deuxième division de méiose en expulsant le deuxième globule polaire contenant la moitié des chromatides sœurs. Chez la femme, la méiose est asymétrique et discontinue. Chez l'homme, les cellules germinales initient la méiose juste avant la puberté. La méiose n'est pas synchrone et une nouvelle population de cellules germinales entre en méiose à chaque nouvelle vague de spermatogenèse. Les deux divisions de méiose sont successives, sans arrêt

et aboutissent à quatre cellules filles haploïdes d'aspect cytologique identique : les spermatides (futurs spermatozoïdes). Chez l'homme, la méiose est continue et symétrique (Figure 23).

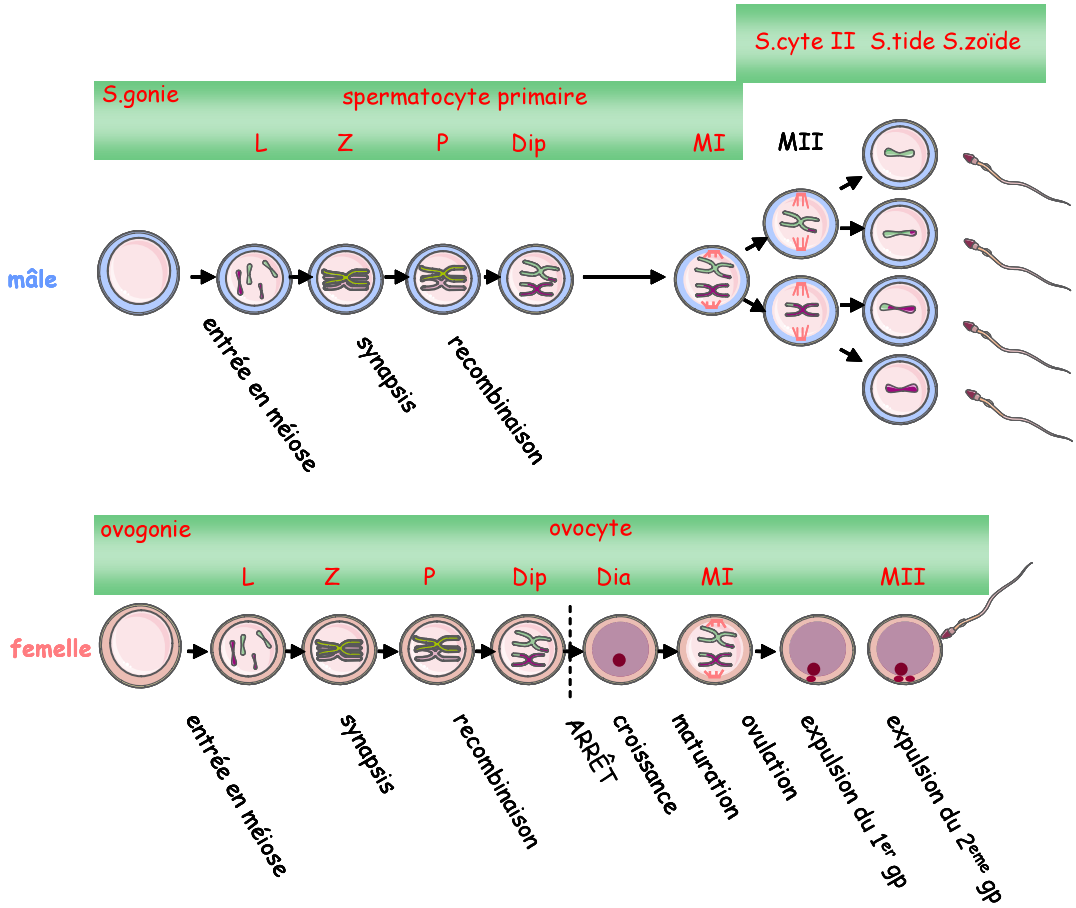


FIGURE 23 : La méiose chez l'Homme, description générale
Chez l'homme, les cellules germinales diploïdes (2n2c ; spermatogonies/ S.gonie), entrent en prophase I (spermatocytes/ S.cyte) à partir de la puberté et progressent jusqu'à la première division de méiose (MI, 1n2c) puis la deuxième division de méiose (MII) aboutissant à 4 cellules filles haploïdes (1n1c, spermatides) identiques qui se différencieront ensuite en spermatozoïdes. Chez la femme, les cellules germinales diploïdes (2n2c, ovogonies) entreront en prophase I de méiose (ovocyte) pendant la vie fœtale et s'arrêteront au stade diplotène jusqu'après la puberté. Au moment de l'ovulation, l'ovocyte recruté finira la première division de méiose en expulsant le premier globule polaire (GP) et parcourra la deuxième division de méiose jusqu'à la métaphase. Au moment de la fécondation , l'ovocyte finira la deuxième division de méiose et expulsera le deuxième globule polaire (Sasaki and Matsui, 2008).

La méiose permet un important brassage génétique, conduisant à une augmentation de la variabilité génétique découlant principalement de deux mécanismes différents. Le premier est lié à la répartition aléatoire des chromosomes d'origine paternelle et maternelle entre les cellules filles au cours de la division méiotique I. Ce mécanisme permet à un organisme de

produire à partir d'une cellule diploïde des gamètes haploïdes génétiquement différents entre eux. Ainsi, l'Homme est capable, à partir des ses 23 chromosomes, de générer $8{,}3.10^6$ gamètes haploïdes différentes. Le second mécanisme intervient en prophase I de méiose. La réparation des cassures doubles brins de l'ADN (CDB) formées en début de prophase I de méiose et réparées par recombinaison homologue (RH) induisant des échanges réciproques entre des chromatides des chromosomes homologues d'origine maternelle et paternelle, appelés crossing-over. La première évidence génétique de ce brassage a été décrite en 1915 (Morgan et al., 1915).

La suite de ce manuscrit sera axée sur la prophase I de méiose qui a lieu dans l'ovaire humain pendant la vie fœtale. Les mécanismes impliqués ont été largement décrits chez différents organismes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* mais également chez les mammifères et l'Homme. Les mécanismes précis de régulation de la prophase I de méiose ne font pas l'objet de ce manuscrit et nous n'exposerons que les grandes étapes nécessaires à la compréhension de cet événement et justifiant la pertinence du choix de nos marqueurs de méiose retrouvés en partie « Résultats » de ce manuscrit (pour revue Baudat et al., 2013)

3.2.4.2 Prophase I de méiose et recombinaison homologue

La prophase I se distingue de la prophase de mitose par: i) sa durée de résolution plus longue que celle d'une prophase de mitose, ii) l'appariement des chromosomes homologues, iii) la formation des cassures double brins de l'ADN qui autorisent alors iv) les évènements de crossing-over/recombinaison entre chromosomes homologues.

La complexité de la prophase I de méiose a conduit les cytologistes à la diviser en cinq stades séquentiels — *leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacinèse* — définis par les changements morphologiques de la chromatine associés à l'assemblage et au désassemblage du complexe synaptonémal (Moses, 1956) (Figure 24).

Après la phase S pré-méiotique appelé le pré-leptotène (phase de réplication de l'ADN), les chromatides nouvellement répliquées vont s'associer avec leur chromatide sœur grâce à un complexe protéique en forme d'anneau, les cohésines, composé de sous-unités spécifiques de la méiose et différentes des cohésines observées au cours d'une mitose : Recombinase-8 (REC8), Structural maintenance of chromosomes-1β et -3 (SMC-1β, -3), et enfin Stromal

antigen 3 (STAG3). Cette association de protéines structurelles autorise un alignement parfait entre chromatides et empêche leur séparation prématurée en cours de prophase I (pour revue Revenkova and Jessberger, 2005). Chez la souris, l'invalidation de *Smc1β* ou *Rec8* empêche la mise en place correcte des éléments latéraux (EL) (Figure 24) et la méiose se bloque au stade zygotène/pachytène (Pezzi et al., 2000; Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004).

En début de stade leptotène (du grec *leptos*, mince, et *tenein*, étirer) les premiers éléments du complexe synaptonémal, les EL, constitués des protéines Synaptonemal complex 2 et 3 (SYCP2, 3) vont s'ancrer *via* les cohésines le long des chromatides homologues (Kolas et al., 2004). A ce stade, les chromosomes se compactent et commencent à être visibles en microscopie optique. Le long des chromosomes, il est possible de distinguer des régions plus ou moins épaisses irrégulièrement espacées à la manière d'un collier de perle. Cet aspect correspond à l'association presque complète des chromatides sœurs.

En début de stade zygotène (du grec *zugon*, paire) les chromosomes homologues commencent à s'apparier entre eux grâce à la formation de l'élément central (EC) du complexe synaptonémal (CS) constitué de la protéine SYCP1 sur laquelle va se fixer *Synaptonemal complex central element 1*, 2 (SYCE-1, -2) et *Testis expressed sequence 12* (TEX 12) de manière à stabiliser ce complexe (Hamer et al., 2006; Bolcun-Filas et al., 2007) (Figure 24). Les paires de chromosomes accolés constituent des bivalents. La mise en place des EC entre les EL se propage vers les télomères des chromosomes, à la manière d'une « fermeture éclair » pour former le CS. A ce stade, l'enveloppe nucléaire donne l'impression de se fragmenter et la chromatine présente un aspect très condensé du fait de la compaction importante des chromosomes (Bezard and Mauleon, 1984).

En début de stade pachytène (du grec *pakhus*, épais), les chromosomes homologues ont achevé leur appariement. Le synapsis est complet et les chromosomes ont échangé entre eux leur matériel génétique par crossing-over. A ce stade, l'enveloppe nucléaire s'est reformée et les chromosomes sont suffisamment épais pour être individualisables en microscopie optique (Holm, 1986).

En début de stade diplotène (du grec *diploos*, double), le complexe synaptonémal se dissocie presque intégralement. Quelques résidus du complexe sont conservés au niveau des centromères et des régions de crossing-over (chiasma) empêchant la séparation complète des chromosomes homologues. Chaque bivalent est donc constitué de deux chromosomes soit 4 chromatides constituant ainsi des tétrades. Cette phase est reconnaissable par l'augmentation

de taille du noyau, la chromatine qui s'affine suite à la séparation incomplète des chromosomes homologues et à la fragmentation du complexe synaptonémal et la présence du nucléole de nouveau visible (Figure 24).

Au stade de diacinèse, la contraction des chromosomes s'accentue et les chiasmas glissent vers l'extrémité des bras des chromosomes (télomères) et leur nombre diminue. Ce phénomène est appelé « terminalisation » des chiasmas. A la fin de la diacinèse, l'enveloppe nucléaire et les nucléoles disparaissent, et un fuseau de division analogue au fuseau mitotique est mis en place. La division cellulaire se poursuit ensuite par la métaphase I, l'anaphase I et la télophase I puis la méiose II, assez comparable à une mitose, sans réplication de l'ADN préalable.

Chez l'homme, la méiose commence à la puberté et les divisions de méiose I et II s'enchainent pour former en environ 16 jours 4 spermatides à partir d'un spermatocyte. Chez la femme, les ovocytes vont rester bloqués en fin de stade diplotène I depuis la vie fœtale jusqu'à l'ovulation 15 à 50 ans plus tard. Les premières cellules en stade préleptotène/leptotène sont observables chez la femme vers 10-11 sg alors que les premières cellules au stade diplotène sont décrites à partir de 15-16 sg et les premiers follicules vers 17-20 sg (Childs et al., 2011). Il n'est pas clairement établi aujourd'hui si les CG femelles parcourent la prophase I plus lentement que les CG mâles ou si la méiose s'initie par vague et que les premiers ovocytes n'atteignent pas les stades avancés de la prophase I et dégénèrent avant.

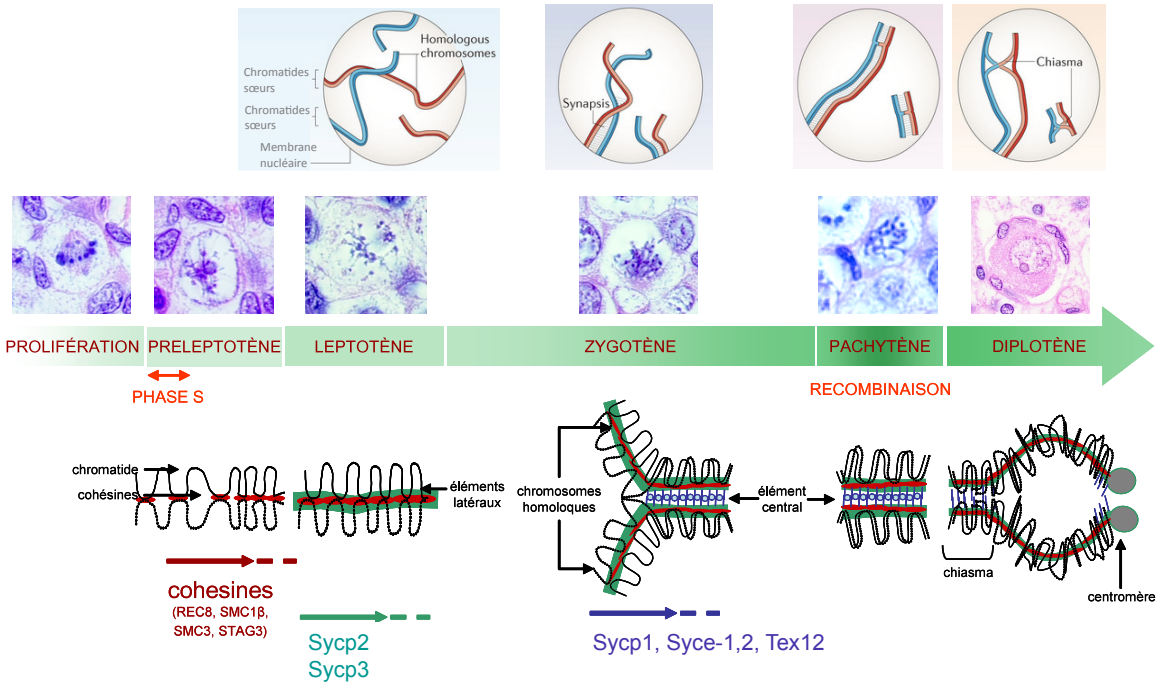


FIGURE 24 : Description de la prophase I de méiose.
En haut, cellules germinales humaines à différents stades de prophase I de méiose (coloration hématoxyline/éosine, données personnelles). L'état de condensation de la chromatine est un critère majeur permettant de distinguer chaque phase et correspond à la formation du complexe synaptonémal. En bas, schématisation de la formation du complexe synaptonémal : alignement des chromatides sœur après recrutement des cohésines, mise en place des éléments latéraux, appariement des chromosomes homologues grâce à l'élément central du complexe, résolution de l'appariement sauf au niveau des chiasmas (Eijpe et al., 2003; Baudat et al., 2013).

Cassures doubles brins et recombinaison

Après la phase S pré-méiotique, au stade préleptotène, de nombreuses cassures doubles brins (CDB) de l'ADN sont générées. Le nombre de CDB engendrées n'est pas clairement établi mais on peut s'attendre à plusieurs centaines par homologie avec la souris (200 à 400 chez la souris). Les CDB sont réparées par recombinaison homologue (RH), unique voie de réparation de l'ADN autorisée au cours de la méiose. La résolution des RH conduit ou non à la formation de crossing-overs (il faut au moins un crossing-over par bivalent, environ 50 chez l'Homme (Gruhn et al., 2013) Les CDB sont générées par la protéine Sporulation protein homolog-11 (SPO11), spécifique de la méiose, *via* son activité catalytique topoisomérase-like de type II (Keeney, 2001) (Figure 25). Chez la souris, l'invalidation de *Spo11*, empêche la survenue de CDB, l'appariement des chromosomes homologues et la RH. Les souris sont stériles (Baudat et al., 2000). D'autres protéines comme Meiosis inhibitor-1 et 4 (MEI1, 4), partenaires de SPO11, participent également à la formation des cassures double brins (Libby

et al., 2002; Kumar et al., 2010) (Figure 25). Leur invalidation chez la souris aboutit à un phénotype similaire de celui observé chez les souris *Spo1*$^{-/-}$.

La reconnaissance des CDB se fait grâce au complexe MRN composé de trois protéines (Meiotic recombination 11 (MRE11), RAD50 et Nijmegen breakage syndrome protein 1 (NBS1) (Carney et al., 1998) (Figure 25). Le complexe MNR va permettre le recrutement de protéines d'activité kinase comme Ataxia telangiectasia mutated (ATM). Ces kinases vont phosphoryler certains substrats comme le variant « X » de l'histone 2A en position γ (γH2AX) en sa partie COOH terminale. Cette phosphorylation permettrait le recrutement au niveau des CDB de protéines de réparation.

Différentes voies de réparation des CDB sont possibles, les deux principales étant le Non homologous end joining (NHEJ) et la recombinaison homologue. Le NHEJ n'utilise pas de matrice homologue pour la réparation et ligature les extrémités cassées. Cette réparation conduit généralement à une modification locale de l'information génétique et donc à l'apparition de mutations. La RH est un processus de réparation de l'ADN «fidèle», elle nécessite la présence d'une matrice pour la neo-synthèse de séquence de l'ADN lésée par homologie. En méiose, la voie du NHEJ est réprimée et la réparation des CDB se fait exclusivement par RH (Goedecke et al., 1999). Des recombinases telles que Dosage suppressor of MCK1 homolog (DMC1) et DNA repair protein-51 (RAD51), vont reconnaître les sites de cassures via γH2AX et vont faciliter l'invasion des brins d'ADN inter chromosomiques (Masson and West, 2001). Il se forme une connexion entre le brin d'ADN simple brin de la CDB et la matrice d'ADN double brin de la chromatide du chromosome homologue. Cette étape entraîne sur la chromatide homologue le déplacement du brin d'ADN de même polarité formant une structure appelée D-loop. A partir de ce moment, deux voies de réparation de l'ADN par RH peuvent se mettre en place : **1)** la formation d'une double jonction de Holliday dont la résolution aboutit à des évènements de conversion génique associés ou non à la formation de crossing-over (Double strand break repair model (DSBR)) soit **2)** la libération du brin homologue sans formation de double jonction de Holliday ni crossing over (Synthesis-dependent strand annealing (SDSA)) (Figure 25).

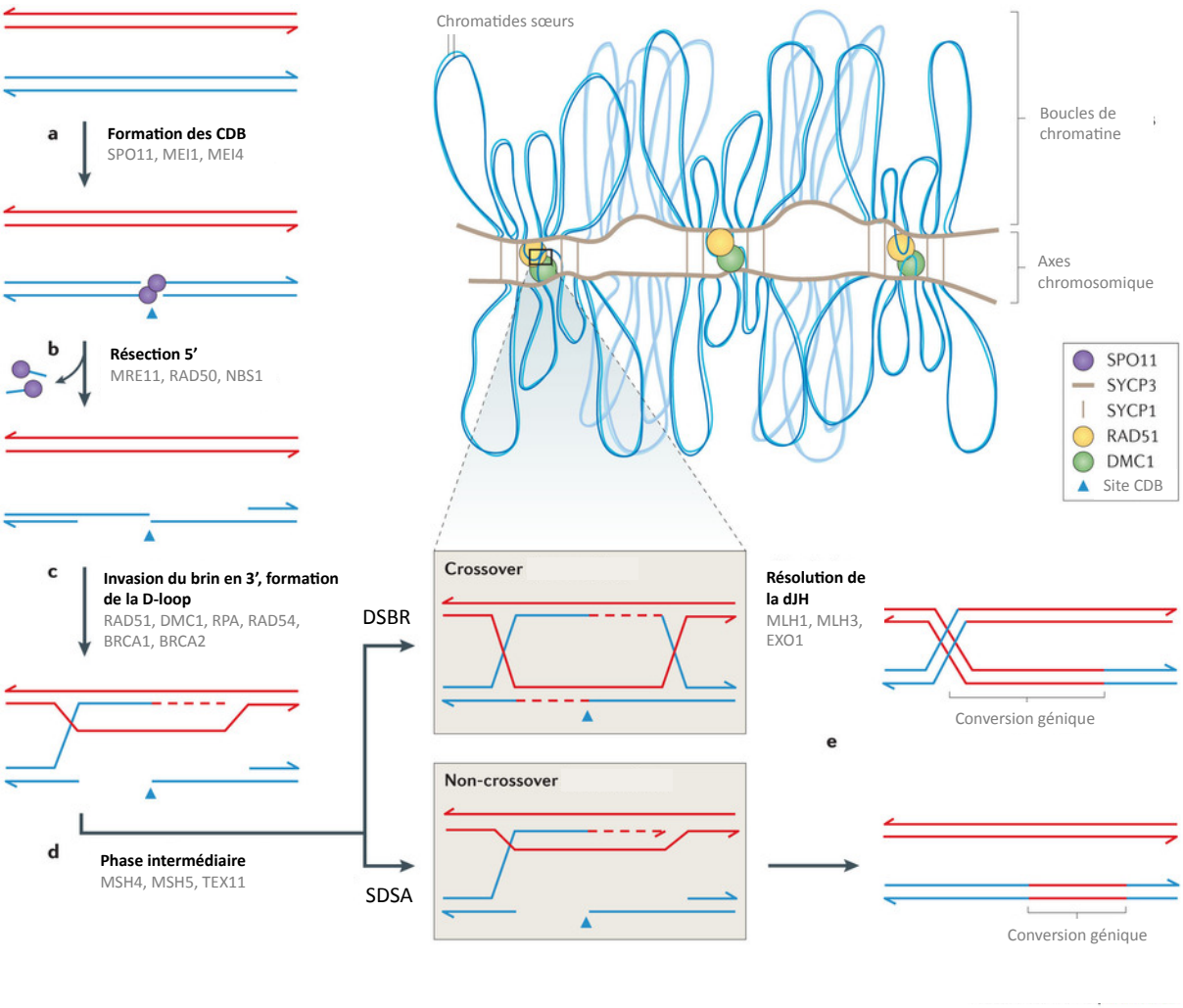


FIGURE 25 : Représentation schématique de la réparation des cassures doubles brins de l'ADN par recombinaison homologue.

En rouge et bleu est représenté l'ADN de deux chromosomes homologues. En pointillé est représenté l'ADN nouvellement synthétisé. Les principales protéines recrutées sont indiquées (non exhaustif) (Baudat et al., 2013).

Il est intéressant de remarquer que toutes les cassures doubles brins de l'ADN générées par SPO11 ne conduisent pas à un crossing-over. La plupart des réparations sont assurées par la voie SDSA, seulement un petit nombre sont réparées par la voie DSBR, aboutissant majoritairement à des crossing-overs. Différentes protéines sont nécessaires pour stabiliser l'ADN simple brin, favoriser le synapsis avec le brin homologue et son invasion, notamment MutS homolog 4 et 5 (MSH4, 5), ou encore Postmeiotic segregation increased 2 (PMS2), MutL homolog-1 et -2 (MLH-1,-2).

De nombreuses erreurs peuvent survenir au cours de la méiose. Il existe donc de nombreux points de contrôle pour assurer des gamètes contenant une information la plus juste possible même si certaines anomalies échappent au réseau de surveillance. Tout défaut dans ce processus peut conduire à l'apoptose des cellules germinales afin d'éviter la transmission de matériel génétique erroné à la descendance. Il est intéressant de préciser que la fréquence des aneuploïdies est plus importante dans les ovocytes humains que dans les spermatocytes (pour revue Taylor et al., 2014). Cette différence peut s'expliquer par des mécanismes de contrôle différents dans les CG mâles ou femelles ou d'efficacité non semblable. Le taux d'aneuploïdie dans les ovocytes augmentant avec l'âge, cette différence pourrait également s'expliquer par un l'état « quiescent » des ovocytes pendant plusieurs années, pouvant les rendre plus vulnérables à une instabilité génétique. De plus, il semblerait qu'il existe des différences spécifiques du sexe dans la RH chez l'Homme notamment en termes de nombre de CDB, longueur du CS et taille de la DNA-loop (Gruhn et al., 2013).

En conclusion, la méiose est un processus hautement orchestré et complexe qui diffère d'une division mitotique classique. Ce processus hautement spécialisé va permettre la formation de cellules haploïdes, dans lesquelles un système de réparation de l'ADN particulier permettra un brassage génétique. Toutes les cellules de l'organisme sont capables d'effectuer une division mitotique a un moment donné alors que seules les CG localisées dans les gonades peuvent entrer en méiose. Un équipement enzymatique spécifique est nécessaire, comme par exemple les protéines SPO11, MEI1, MEI4, REC8, recrutées uniquement au cours d'une division méiotique. Cette distinction mitose/méiose et les nombreuses redondances dans la machinerie mitotique permettent de « protéger » l'individu d'un défaut de division mitotique. En revanche, cela suppose une régulation spécifique et distincte entre les deux systèmes. De nombreux modèles de souris déficientes pour un des facteurs cités précédemment ont été élaborés. Les animaux sont vivants mais stériles avec le plus souvent un blocage méiotique en stade zygotene/pachytène.

4. Les perturbations non génétiques du développement ovarien

La mise en place de la lignée germinale au cours du développement embryonnaire est une des étapes cruciales conditionnant la fertilité à l'âge adulte. Cette période clé nécessite la mise en œuvre de nombreuses voies de signalisation dont celles connues ou suspectées ont été exposées précédemment. Elle est donc la cible possible de nombreuses perturbations par des xénobiotiques.

Ce chapitre a pour but de dresser l'état des lieux des perturbateurs connus du développement gonadique chez l'Homme et antérieurs à nos travaux. Nous aborderons plus précisément le cas particulier des glucocorticoïdes, sujet d'une partie de ces travaux de thèse, dans l'introduction de la partie « Résultats 3 ».

Le concept de toxicologie environnementale a émergé au cours des 20 dernières années. L'Homme est continuellement exposé à des milliers de substances chimiques d'usage industriel (détergents, éthers de glycol, plastifiants,…), agricole (insecticides, herbicides, fongicides), ou se retrouvant dans des produits de consommation (colorants, cosmétiques, emballages, contenants alimentaires, médicaments…). Les données toxicologiques ne sont connues que pour moins de 5% d'entre-elles et sont réalisées sur des modèles animaux pouvant présenter de nombreuses différences développementales par rapport à l'Homme. Parmi les xénobiotiques, certains sont capables d'interférer avec nos systèmes de régulations endocrines et ont été désignés sous le terme de « perturbateurs endocriniens » (PE) (Kavlock et al., 1996). Plus de 1000 molécules dans notre environnement sont susceptibles d'être des PE, et les recherches toxicologiques se sont particulièrement intéressées à cette catégorie de xénobiotiques. On y trouve des produits chimiques synthétiques : produits industriels (polychlorobiphényles (PCB), alkylphenols), plastifiants (phtalates, bisphénol A (BPA)), produits agricoles (insecticides, fongicides, herbicides). Mais aussi des produits de combustion (dioxine, furane, cadmium) et des substances issues de l'industrie pharmaceutique (hormones de synthèse, médicaments). Enfin, certains PE d'origine naturelle comme les phyto-œstrogènes (soja), les isoflavonoïdes (luzerne) et les lignanes (lin) sont trouvés dans certains végétaux. De nombreux polluants environnementaux incriminés ont une activité œstrogénique (xéno-estrogènes) ou antiandrogénique et peuvent interférer avec notre système hormonal.

Dès les années 60, quelques scientifiques comme Rachel Carson accusent les polluants environnementaux d'être responsables de troubles de la Reproduction observés chez des animaux (Carson, 1962) comme par exemple la féminisation de poissons des grands lacs américains contaminés par des PCB. Ces donnés issues de l'étude de la faune sauvage, parallèlement à quelques données épidémiologiques chez l'Homme rapportant par exemple une diminution significative du sexe ratio (avantage féminin) dans les population des grands lacs américains pollués ont permis d'alerter les scientifiques. Chez l'homme, plusieurs études épidémiologiques relatent une baisse de la fonction de reproduction masculine au cours des dernières décennies (pour revue Damstra et al., 2002). L'analyse des critères spermatiques d'une population d'hommes ayant fait don de leur sperme (hommes que l'on peut déclarer fertiles de par l'obligation d'être père pour être donneur de sperme en France jusque 2013) a montré qu'en moyenne, les critères spermatiques avaient chuté en métropole de 1,9% par an au cours des deux dernières décennies (Rolland et al., 2013). Parallèlement, l'incidence des cancers testiculaires a augmenté de façon régulière au cours des dernières années dans tous les pays industrialisés (2,5 % d'augmentation par an, données InVS). Sa prévalence est en moyenne de 10/10000 chez les hommes entre 20 et 30 ans, et varie en fonction des régions, avec une augmentation en Bretagne et en Alsace-Lorraine (données InvS). Enfin, l'incidence des cas d'hypospadias et de cryptorchidie a également fortement augmenté, passant respectivement de 0,2 à 0,35% et de 2 à 3,5% en Europe entre 1970 et 1991 (Pierik et al., 2002; Aho et al., 2003). Le postulat d'une origine commune à ces quatre affections (diminution du nombre de spermatozoïdes produits, cancer testiculaire, hypospadias et cryptorchidie) a été avancé. Il a été remarqué que ces évènements étaient souvent liés. Un antécédent de cryptorchidie dans l'enfance prédisposait plus à la survenue d'un cancer testiculaire à l'âge adulte ou l'hypospadias à une oligospermie par exemple. Ces affections ont été regroupées dans un même syndrome appelé Syndrome de Dysgénésie Testiculaire (TDS) dont l'origine serait une perturbation du développement des organes reproducteurs pendant la vie fœtale (Skakkebaek et al., 2001). L'hypothèse d'une causalité environnementale au TDS a été avancée.

Chez la femme, il n'a pas été décrit de syndrome regroupant plusieurs affections induites par une perturbation de l'appareil reproducteur au cours de la période fœtale. Cependant, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme avec 48800 nouveaux cas par an en France (soit environ 100/100 000, données InVS) et reste la première cause de décès par cancer chez la femme (11886 décès par an, données InVS). Des pathologies comme

l'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) ou le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) n'ont, la plupart du temps, aucune étiologie retrouvée. Pourtant ces pathologies sont souvent responsables d'infertilité. Les récentes données épidémiologiques chez l'homme et le nombre croissant de couples consultant pour une prise en charge en AMP, laissent suspecter un potentiel effet délétère des PE chez la femme également. Dans le cas du SOPK, par exemple, le BPA a été suspecté comme agent perturbateur du système hormonal engendrant une hypersécrétion de LH, une oligo- ou aménorrhée, un excès folliculaire et éventuellement un hirsutisme et/ou une surcharge pondérale dans sa forme classique. Les taux sériques de BPA chez des patientes présentant un SOPK (critères du NIH consensus) ont été retrouvés significativement plus élevés que ceux de patientes contrôles (Kandaraki et al., 2011). Il a été montré chez le rat qu'une exposition pendant la vie fœtale au BPA induisait un phémotype de type SOPK à l'âge adulte (Jimenez-Diaz et al., 2010). Ces résultats suggèrent que chez la femme, l'exposition fœtale aux PE pourrait entraîner ce type de syndrome et une infertilité à l'âge adulte.

Les études expérimentales chez le rongeur et les observations cliniques suggèrent q'une exposition fœtale à un xénobiotique pourrait perturber les grandes étapes du développement. Les mécanismes d'action, les doses en jeu et la potentialisation des effets en présence de plusieurs substances doivent être étudiés. L'étude de la toxicologie sur le développement gonadique humain est assez récente et peu de données sont disponibles. Les données épidémiologiques pâtissent souvent des facteurs confondants liés à l'hygiène de vie des patients exposés (tabagisme, nutrition,…), à l'imprécision concernant les doses et les durées d'exposition, aux variabilités génétiques et aux imprécisions des dossiers médicaux. Elles sont essentielles pour alerter et renforcer la nécessité d'études toxicologiques mais n'apportent pas la preuve d'une causalité. Nous exposerons uniquement, dans ce chapitre d'introduction, les rares études apportant la preuve d'importantes perturbations du développement gonadique chez l'Homme lors d'une exposition fœtale à un xénobiotique.

Le premier, le 4-octylphénol, sert d'intermédiare dans la fabrication de résines phénoliques ou d'agent émulsifiant dans la fabrication de polymères, textiles, peintures et pesticides. L'Union Européenne en produit 23000 t/an. Ce xénobiotique présente une capacité de liaison aux ERs (White et al., 1994), et diminue la prolifération mitotique et donc le nombre de cellules germinales dans un modèle de culture organotypique de testicules fœtaux humains âgés de 6 à 9 sg (Bendsen et al., 2001). Malgré les enjeux financiers représentés par la substitution de ce produit dans les procédés industriels, le 4-octylphénol a été inscrit sur la liste OSPAR des

produits chimiques devant faire l'objet de mesures prioritaires et les rejets ou pertes d'octylphénol doivent cesser d'ici l'année 2020.

Le diéthylstilbestrol (DES), ou distilbène ®, est un œstrogène de synthèse qui a été administré des années 40 aux années 80 (de 1948 à 1977 exactement en France) à environ 10 millions de femmes enceintes pour prévenir les avortements spontanés, les hémorragies gravidiques, la toxémie gravidique ou même le diabète gestationnel (Giusti et al., 1995). Ce n'est qu'en 1971 que des cas répétés de cancer du vagin chez de jeunes filles exposées *in utero* alertent mais il faudra attendre encore plusieurs années avant que sa prescription ne soit interdite chez la femme enceinte. D'autres complications uro-génitales (malformations utérines, anomalies urétrales, hypospadias, cryptorchidie, cancers génitaux) ont été décrites chez les femmes et hommes exposés au DES pendant la vie fœtale (Gill et al., 1979; Klip et al., 2002; Palmer et al., 2005; Palmer et al., 2009). Il a été rapporté un effet possible transgénérationnel du DES engendrant une augmentation des risques carcinogènes (Walker and Kurth, 1995) et des cas d'hypospadias chez les fils des mères exposées *in utero* (Klip et al., 2002; Brouwers et al., 2006) et jusque dans la 3ème génération de familles exposées (Kalfa et al., 2011).

Enfin, l'analyse de testicules et ovaires fœtaux humains de mères fumeuses ou non ou exposés *in vitro* à des composants de fumée de cigarette a montré une diminution significative du nombre de CG dans les gonades exposés à la fumée de cigarette maternelle (Mamsen et al., 2010 ; Anderson et al., 2014). Les effets du tabac sur l'appareil respiratoire sont largement débattus et à l'origine d'évolutions sociétales ces dernières années. Ces deux études renforcent l'intérêt des débats publics autour du tabagisme actif et passif en apportant de nouveaux arguments sur de possibles atteintes extra-pulmonaires.

Les études de reprotoxicité des substances chimiques sont réalisées chez le rongeur. Pourtant, comme nous l'avons montré dans les chapitres précédents, les mécanismes de mise en place de la lignée germinale semblent différer entre l'Homme et les modèles rongeurs. L'utilisation de plus en plus courante de produits chimiques variés, ayant un caractère de perturbateurs endocriniens ou non et qui se retrouvent en concentration croissante dans l'environnement, semble être une cause importante de l'apparition de troubles de la fonction de reproduction. Compte tenu de la multiplicité des composés chimiques pouvant ainsi se retrouver répandus dans l'environnement, ce phénomène représente désormais un réel enjeu de santé publique et de politique environnementale. De même, les effets d'agents administrés au cours de la

grossesse sont mals connus et le « résumé des caractéristiques du produit » des médicaments commercialisés en France précaunise pour la majorité de ne pas l'utiliser au cours de la grossesse, par mesure de précautions et manque de données. Malgré l'expérience dramatique du DES chez l'Homme, certains médicaments sont administrés au cours de la grossesse dans le cadre de risques pathologiques graves pour la mère ou le fœtus sans autre alternative possible mais parfois à titre préventif. C'est le cas de la dexaméthasone, glucocorticoïde administré à la femme enceinte dans le cadre d'un bloc enzymatique pour prévenir d'un risque de virilisation du fœtus feminin. Nous avons testé les effets de ce médicament et les résultats obtenus sont présentés dans la partie « Résultats 3 ».

Principales méthodologies

Ce chapitre présente les principales méthodes utilisées dans les travaux de cette thèse. Il ne fait pas l'objet d'un chapitre « Materiel et méthodes » exhaustif, mais a pour but de faciliter la compréhension du lecteur sur le choix des techniques moins usuelles adaptées à l'étude des gonades humaines. Les études menées en parallèle sur les gonades fœtales murines, nous ont permis de confirmer nos choix expérimentaux menés chez l'Homme. La méthodologie concernant les techniques classiques de prélèvement des gonades murines (Guerquin et al., 2010) et isolement des CG chez la souris (Yoshimizu et al., 1999) est disponible dans les différents articles de ce manuscrit.

1 Prélèvements de gonades fœtales humaines

1.1 Contexte

L'interruption volontaire de grossesse (IVG) a été légalisée en France en 1975 (Loi Veil). Le terme légal limite d'interruption a été allongé en 2001 de 10 sg (12 semaines d'aménorrhée) à 12sg (14 semaines d'aménorrhée). Au delà de ce terme, l'avortement est possible, jusqu'à la fin de la grossesse, sur indications médicales et après avis consultatif d'une équipe pluridisciplinaire. On parle alors d'interruption médicale de grossesse (IMG). Le rapport d'activité des 47 centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN) français rédigé par l'Agence de la Biomédecine donne, pour l'année 2010, 7141 autorisations délivrées en vue d'une IMG et 668 grossesses poursuivies sur demande maternelle mais qui auraient pu faire l'objet d'une demande d'autorisation d'IMG. L'indication de l'IMG est chromosomique dans 38,5% des cas (le plus fréquemment pour syndrome de Down ou trisomie 21), ou pour malformations graves ou syndrome polymalformatif dans 44% des cas. Les demandes d'IMG pour maladies géniques sont plus rares (6,2%), les parents ignorant souvent le risque de transmission d'une maladie génétique grave. D'autres indications fœtales comme des infections congénitales ou maternelles (survenue d'une pathologie grave pendant la grossesse, troubles psychiatriques) peuvent faire l'objet d'une autorisation d'IMG.

Il existe une disparité importante concernant l'accès des femmes à l'IVG en Europe. De rares pays comme les Pays-bas ou le Royaume-Uni sont moins restrictifs sur le terme de la grossesse. Au pays-bas, l'avortement est autorisé sur demande de la femme sans que la loi ne précise de délai. La limite est en général fixée à 24 sg. En Angleterre, l'interruption de grossesse est autorisée jusqu'à 24 sg et au-delà sur indications médicales. En revanche, dans

d'autres pays, l'accès à l'IVG reste très restreint voire illégal. L'Irlande a autorisé l'avortement très récemment, en Juillet 2013, mais dans un cadre très restrictif. Il n'est autorisé que si la mère court un risque médical grave. En Pologne, l'interruption de grossesse n'est possible avant 12 sg qu'en cas de viol, inceste, malformation fœtale ou risque médical pour la mère. En Espagne, la loi de 2010 autorisait l'interruption de grossesse jusqu'à 14 sg volontairement et jusqu'à 22 sg sur indications médicales. Depuis 2013, l'avortement n'est pratiquement plus possible et n'est autorisé qu'en cas de viol ou de danger pour la mère. L'avortement reste illégal, à ce jour, à Malte.

En France, la recherche sur les produits d'IVG et d'IMG est soumise à un régime de déclaration du protocole de recherche auprès de l'Agence de Biomédecine. Les patientes sont informées et doivent signer un consentement si elles acceptent de participer au projet de recherche. Grâce à une collaboration avec le service de Gynécologie-Obstétrique de l'hôpital Antoine Béclère dirigé par le Pr. Alexandra Benachi, initialement mise en place entre le Pr. René Frydman et le Pr. René Habert, nous disposons de prélèvements fœtaux au Laboratoire de Développement des Gonades (LDG). Les fœtus issus d'IVG présentent un risque d'anomalie égale à celui de la population générale. L'IVG est réalisée par aspiration sous anesthésie locale ou générale, sans médication. Les gonades sont récupérées dans les 2 heures suivant l'interruption.

1.2 Isolement des gonades fœtales

Les gonades fœtales sont isolées des produits d'IVG dans un laboratoire de niveau L2 sous une loupe binoculaire, les fragments du fœtus sont récupérés au sein des débris d'aspiration et les gonades doivent être repérées et prélevées. Le pourcentage de récupération des gonades n'est que d'environ 50% car leur petite taille rend extrêmement difficile leur identification au sein des débris d'aspiration. Des ovaires sont donc récupérés dans 25% des cas, parfois une seule gonade sur les deux est retrouvée. L'âge des fœtus est calculé en se basant sur la mesure de critères morphométriques et un calcul mathématique mis au point par Evtouchenko et col. (Evtouchenko et al., 1996) basé sur la mesure de cinq paramètres morphologiques du fœtus :

- PAL = Proximal Arm Length: distance épaule-coude en mm.
- DAL = Distal Arm Length: distance coude-main en mm.
- PLL = Proximal Leg Length: distance fessier-genoux en mm.
- DLL = Distal Leg Length: distance genoux -talon en mm.
- FL = Foot Length: longueur du pied en mm.

$$\textbf{AGE (en jours post - conception)} = \frac{\mathrm{LN(PAL) + 0{,}566}}{0{,}045} + \frac{\mathrm{LN(DAL) + 0{,}668}}{0{,}048} + \frac{\mathrm{LN(PLL) + 0{,}997}}{0{,}049} + \frac{\frac{\mathrm{LN(DLL) + 0{,}630}}{0{,}043} + \frac{\mathrm{LN(FL) + 0{,}489}}{0{,}036}}{5}$$

Il est à noter que seuls trois paramètres (DAL, DLL et FL) sont le plus souvent accessibles, la formule peut alors être simplifiée et la division terminale se fait par trois au lieu de cinq. L'âge obtenu à partir de la formule présentée ci-dessus est exprimé en jours post conception puis converti en semaines de gestation.

Dans de rares cas, notre collaboration nous a permis d'avoir accès à des gonades tardives (jusqu'à 35 sg) issues de produits d'IMG. Dans ce cas, le taux de malformations fœtales est supérieur à la normale même si des interruptions médicales de grossesses ont parfois lieu dans le cadre de maladies graves n'impliquant pas de désordre du développement sexuel. Les gonades de plus de 12 sg ne sont obtenues après consentement du ou des parent(s) que lorsqu'il y a une nécessité médicale de pratiquer une autopsie sur le fœtus. Le service d'Anatomo-fœtopathologie de l'Hôpital Antoine Béclère dirigé par le Pr Sophie Prévot réalise le prélèvement des gonades que nous récupérons ensuite, dans du milieu de culture simple. En France, l'accès aux produits d'IVG est plus simple que dans la plupart de nos voisins européens. En revanche, il est difficile d'obtenir des gonades fœtales tardives dans des conditions compatibles avec des protocoles nécessitant du tissu vivant. Les parents doivent donner leur accord pour l'autopsie du fœtus, être informés du but scientifique et signer un consentement éclairé concernant la recherche sur les gonades. Avant 16-17 sg, l'IMG peut être réalisée par aspiration si l'opérateur est expérimenté et si la patiente ne désire pas voir le corps du fœtus. Mais en général, l'interruption se fait par administration d'un mélange d'analgésique+fœticide (type thiopental+xylocaïne), si possible par le cordon ombilical, sinon

en intra-cardiaque et le travail est déclenché par des analogues des prostaglandines ou par administration de Mifépristone (RU486). L'autopsie est généralement pratiquée 48 heures après l'administration de l'analgésie-fœticide. Les tissus récuperés sont donc peu viables ce qui limite leur étude à des analyses histologiques ou d'expressions de gènes. La culture ou la greffe des gonades issues d'IMG n'a pour l'instant pas abouti au Laboratoire.

2. La culture organotypique de gonades fœtales

Des tissus ou organes prélevés sur un organisme vivant et, mis dans des conditions de culture adaptées, peuvent survivre en dehors de l'organisme. Cette survie *in vitro* présente un intérêt pour étudier le tissu ou l'organe, les relations entre les différents types cellulaires qui le composent et l'impact sur son développement de facteurs environnementaux comme la composition du milieu de culture, la température ou l'ajout de substances exogènes.

2.1 Approche historique

Les premiers essais de culture d'explants ont été réalisés par l'anatomiste et physiologiste français Alfred Vulpian en 1859 et l'embryologiste allemand Gustav Born en 1897 (Vulpian, 1859; Born, 1897). Leurs travaux ont permis de cultiver dans de l'eau simple des morceaux d'embryons de grenouille, comme la queue des animaux, et observer leurs croissance et différenciation. La culture *in vitro* commence à se développer au début du XXème siècle. En 1907, Ross Harrison publie une nouvelle technique de culture de tissu embryonnaire de grenouille lui permettant d'observer la différenciation et l'organisation des fibres nerveuses. L'explant était déposé sur une lamelle stérile dans une goutte de lymphe fraiche de grenouille adulte, ensuite retournée et posée sur une lame de verre présentant une dépression (technique de culture en goutte suspendue) (Harrison et al., 1907). La culture du tissu n'est possible que quelques jours. Alexis Carrel et Burrows reprennent cette technique à partir de 1910 (Carrel and Burrows, 1910; Carrel and Burrows, 1911). Ils adaptent la technique d'Harrison aux espèces à « sang chaud » (chien, chat, cobaye, rat et poulet) en utilisant du plasma frais de la même espèce. Ce « milieu plasmatique », riche en facteurs de croissance, leur permet de cultiver en goutte suspendue ou sur caillot plasmatique des tissus de différentes espèces et

même des tumeurs humaines. Carrel a beaucoup développé la culture tissulaire grâce à ses travaux sur l'asepsie et la recherche des besoins nutritionnels *in vitro* (Carrel, 1923).

Jusque 1950, l'essor de la culture cellulaire supplante la culture tissulaire. En effet, l'utilisation de lignées cellulaires est facile à mettre en œuvre, reproductible et compatible avec l'utilisation de milieux de culture simples. Mais elle ne permet pas d'étudier l'interaction des cellules d'un même tissu entre elles ni l'influence paracrine d'une population cellulaire sur une autre. De rares chercheurs comme Maximow et Strangeways continuent d'utiliser la culture organotypique pour leurs travaux (Maximow, 1925; Strangeways and Fell, 1926). La technique sur caillot plasmatique présente plusieurs désavantages comme la liquéfaction du caillot par les enzymes du tissu et l'immersion délétère de l'explant. La technique est optimisée à partir de 1951 par Etienne Wolff en cultivant, en chambre fermée, des organes sur un gel semi-solide d'agar-agar contenant le plasma (Wolff and Haffen, 1952). La composition exacte inconnue du plasma rend l'interprétation des résultats obtenus délicate. La mise au point de milieux de culture synthétiques permet de s'affranchir de ce biais (Wolff et al., 1953). Les conditions de culture (nutriments, température, atmosphère gazeuse) sont optimisées (Eagle, 1955; Trowell, 1959). Trowell introduit l'utilisation de grilles métalliques pour cultiver le tissu à l'interface entre le milieu nutritif et l'environnement gazeux.

La culture organotypique a prouvé son efficacité pour la culture de gonades fœtales et postnatales. Nous cultivons actuellement au laboratoire les gonades sur un filtre flottant à l'interface entre le milieu de culture et l'air pour limiter la nécrose de l'organe (Habert et al., 1991). Cette méthode a montré un avantage en terme de stéroïdogénèse (Lecerf et al., 1993), gamétogénèse (Olaso et al., 1998) ou les deux (Livera et al., 2000). Plus récemment, la culture de testicules murins néonataux a abouti à l'obtention de spermatozoïdes matures *in vitro* (Gohbara et al., 2010) capables de féconder un ovocyte et donner des portées bien portantes (Sato et al., 2011). La culture d'ovaire est également possible, bien que plus récemment et moins fréquemment mise en œuvre (Blandau et al., 1965). Elle permet l'étude du développement de l'ovaire fœtal murin et humain (Pesce et al., 1996) et des mécanismes impliqués dans l'entrée en méiose des CG (Le Bouffant et al., 2010). La culture organotypique a surtout été utilisée pour tenter d'obtenir des ovocytes *in vitro* matures à partir de fragments de cortex ovariens adultes. La maitrise de la folliculogenèse *in vitro* est un vrai enjeu thérapeutique. De plus en plus de patientes bénéficient d'une cryoconservation de fragments de cortex ovariens avant la mise en route d'un traitement stérilisant. Pour certaines, la greffe ultérieure de ces fragments n'est pas envisageable car elle présente un risque de

réintroduction de cellules cancéreuses (exemple des leucémies). Cultiver ces fragments *in vitro* pourrait leur offrir la chance d'une grossesse avec leurs propres ovocytes sans le risque de la greffe. Cette technique expérimentale a évolué chez la souris depuis l'obtention d'ovocytes au stade vésicule germinative (Eppig and O'Brien, 1996) jusqu'à l'obtention de portée à partir d'ovocytes issus de la culture *in vitro* de follicules pré-antraux (Wang et al., 2011). Mais aucune étape ne relate de folliculogénèse *in vitro* complète depuis le stade ovogonie. Chez l'Homme, la culture de cortex ovarien adulte permet d'étudier les mécanismes impliqués dans la folliculogénèse et a permis la croissance *in vitro* de follicules primordiaux jusqu'au stade secondaire (Telfer et al., 2008).

2.2 Culture d'ovaires foetaux

2.2.1 Méthode de culture

Les gonades sont mises en culture immédiatement après leur isolement du produit d'IVG. Afin de favoriser l'oxygénation des tissus et de limiter les phénomènes de nécrose, les gonades sont coupées en petits morceaux (<1mm) dans du milieu de culture sous une loupe binoculaire. Le nombre de morceaux dépend de l'âge du fœtus (environ une quinzaine à 10 sg). Les morceaux sont placés jointivement sur des inserts Millicell (Millipore, Billeria, USA) qui flottent à la surface de 320µL de milieu nutritif dans une boite 4 puits (Nunc). L'insert comporte une membrane poreuse (pores de 0,45µm) sur laquelle sont placés les fragments gonadiques ce qui permet à la fois une bonne oxygénation et un apport nutritif des échantillons. La culture est réalisée dans un incubateur thermostaté à 37°C dont l'atmosphère est saturée en vapeur d'eau sous 5% de CO_2 (Figure 26) et le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 heures.

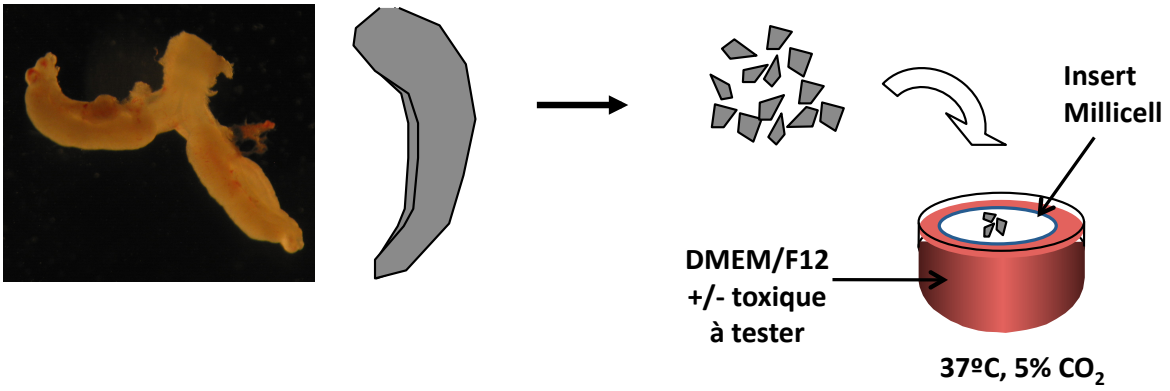


FIGURE 26 : Modèle de culture organotypique utilisé au LDG
Les gonades fœtales sont coupées en petits morceaux (<1mm) déposés ensuite sur des inserts de cellulose affleurant un milieu de culture simple. Le milieu de culture peut être supplémenté en facteurs de croissance ou substance à tester (Lambrot et al., 2006).

2.2.2 Réactifs utilisés

- Le milieu nutritif de base employé pour la culture est le Dulbecco's Modified Eagle Medium/HamF12 (Gibco ; DMEM/F12 : 1/1 v/v), supplémenté de 80 µg/mL de gentamycine (Sigma-Aldrich) et tamponné à 1,5% (HEPES buffer 1M, Gibco).

- Pour les travaux sur la persistance de cellules mitotiques dans l'ovaire fœtal humain présentés en partie « Résultats 2 »

1. la prolifération des cellules germinales a été évaluée par la détection de l'incorporation de 5-Bromo-2-Désoxy-Uridine (BrDU, 30µg/mL, Amersham) après 3, 6, 12, 24, 48 ou 96 heures de culture en présence de 1% de BrDU.

2. la régulation de l'entrée en méiose a été étudiée en cultivant les ovaires fœtaux en milieu nutritif additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma) en condition contrôle, présence d'un inhibiteur spécifique de CYP26B1, le talarozole (1µM, R115866, Clinisciences), présence d'un inhibiteur des récepteurs aux FGF (1µM, PD173074, Clinisciences), présence de ces deux inhibiteurs, ou enfin présence de FGF9 humain recombinant (1µM, TP720175, Clinisciences). Les gonades étaient cultivées 14 jours pour les analyses histologiques ou 24 heures pour l'analyse de la régulation de gènes. Le solvant utilisé (DMSO) était ajouté dans le puits contrôle (Tableau 4).

- Pour l'étude toxicologique de la partie « Résultats 3 », la dexamethasone (Sigma-Aldrich) et la progestérone (Sigma-Aldrich) ont été dissoutes dans de l'éthanol absolu.

1. En vue d'analyses histologiques, les ovaires fœtaux ont été cultivés 14 jours en condition contrôle (sovant seul), en présence de dexaméthasone (2, 10 ou 50µM) ou en présence de dexaméthasone et progestérone (10 µM et 0,32µM respectivement). Du BrdU (1%) était ajouté aux cultures 3 heures avant la fixation.

2. Pour l'analyse de l'expression de gènes, les ovaires fœtaux ont été cultivés en condition contrôle (solvant seul) ou en présence de dexaméthasone (50µM) pendant 6 heures ou 6 jours ou en condition contrôle (solvant seul), en présence de progestérone (0,32µM), ou en présence de dexaméthasone et progestérone (10µM et 0,32µM respectivement) pendant 6 heures (Tableau 4).

Age (sg)	Culture	
7,3	Etude dose/réponse 14j (Dex 0, 2, 10, 50µM)	
8,2		
8,4		
8,6		
9,9		
10,8		
7,4	Effets court terme 6h (Dex 0, 50µM)	
7,8		
8,1		
8,3		
8,4		
10,2		
6,9	Effets combinés 14j ou 6h (Ctr ouPg 0,32µM ou Dex 10µM +Pg 0,32µM)	
7,7		
7,7		
7,8		
8		
8,6		
7	Effets moyen terme 6j (Dex 0, 50µM)	
8		
7,2	Activité mitotique des ovogonies (BrDU 3, 6, 12, 24, 48 et 96h)	
7,8		
8		
8		
8.4		
8,7		
9		Effets moyen terme 6h
9,1		
9,5		
9,5		
9,5		
9,8		
10.1		
10,4		
11,2		
11,8		
9,9	Voies CYP26B1/FGF 14j (Ctr,I1, I2, I1+I2, FGF9r)	
9,9		
10		
10		
10,2		
10,5		
10,9		
8,7	Voies CYP26B1/FGF 24h (Ctr,I1, I2, I1+I2, FGF9r)	
10		
10,5		
10,9		

TABLEAU 4 : Ovaires fœtaux utilisés en culture organotypique

Ce tableau résume le nombre d'ovaires fœtaux utilisés pour les cultures organotypique ayant permis l'obtention des différents résultats présentés dans ce manuscrit. Ctr pour contrôle, Dex pour dexaméthasone, Pg pour progestérone, I1 pour inhibiteur de CYP26B1, I2 pour inhibiteur des récepteurs aux FGF et FGF9r pour FGF9 recombinant. Les ovaires surlignés en bleu correspondent aux cultures de l'article présenté en « Résultats 2 » et ceux surlignés en bleu aux cultures de l'article présenté en « Résultats 3 ».

3. Greffe d'ovaires fœtaux

3.1 Les modèles de xénogreffe de gonades humaines existants

La greffe d'organe est, comme la culture organotypique, une méthode de maintien en vie de l'organe. Le tissu ou l'organe, fœtal ou adulte, peut être greffé sur un site hétérotopique – différent du site initial – ou sur un site orthotopique – transplanté au site habituel. La greffe peut s'effectuer entre individus de même espèce (allogreffe) ou chez un receveur d'une espèce différente de celle du donneur (xénogreffe). La découverte en 1962 de la lignée de souris athymiques « Nude » présentant, suite à une mutation spontanée, un déficit en lymphocytes T a permis de réaliser les premières études de transplantation de tumeurs humaines chez la souris pour en étudier le développement *in vivo* (Rygaard and Povlsen, 1969). La croissance du tissu transplanté va dépendre, entre autres, de la qualité du tissu greffé, du site de greffe, de l'âge et du sexe de la souris receveuse et de l'état de santé de la souris. Chez les souris Nude, la délétion du gène *Foxn1* est responsable de l'immunodéficience par absence de thymus et de l'absence de poils. Il persiste cependant certaines fonctions des lymphocytes T, un taux assez élevé d'anticorps naturels et la présence de cellules Natural killer (NK) qui peuvent interagir avec le transplant. Par la suite, d'autres lignées de souris présentant une immunodéficience plus profonde ont été créées. C'est le cas des souris Nod/SCID atteintes du syndrome d'immunodéficience de type SCID (Severe combined immunodeficiency) qui entraîne une absence complète de lymphocytes T et B par non de recombinaison VDJ du récepteur au lymphocyte T (Bosma et al., 1983). Plusieurs gènes, lorsqu'ils sont mutés, peuvent donner ce syndrome. C'est le cas, par exemple, de la mutation de *Rag1* ou *Rag2* (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).

Lors des premières expériences de xénogreffes, des morceaux de peau de rat et de lapin ont été transplantés chez la souris Nude (Rygaard, 1974a). La technique a ensuite été étendue à la greffe de peau d'autres animaux comme des reptiles et même de la peau humaine (Rygaard, 1974b). Povlsen et col. sont les premiers à rapporter la greffe d'organes fœtaux humains chez la souris Nude en 1974. Dans leur étude, ils greffent en sous-cutané des fragments d'organes de fœtus humains âgés de 14 à 22 sg (Povlsen et al., 1974) dont notamment 5 testicules et 4 ovaires. Ils observent une bonne vascularisation du greffon, une réaction immune minime mais constatent la présence de plages de nécrose dans les tissus greffés. D'autres études rapportent la greffe de gonades fœtales humaines, mais leur nombre reste cependant limité. La xénogreffe d'ovaires fœtaux humains est utilisée dans moins de dix publications (Skakkebaek

et al., 1974; Abir et al., 2000; Abir et al., 2003; Sadeu et al., 2006; Oktem and Oktay, 2007; Abir et al., 2009; Lan et al., 2010; Wu et al., 2010). Toutes ces études relatent la greffe d'ovaires fœtaux tardifs (20 sg et plus) en capsule rénale ou en sous-cutané chez des souris immunodéficientes femelles ovariectomisées. Le développement ovarien (Skakkebaek et al., 1974), la vascularisation de l'organe après greffe (Wu et al., 2010) et l'impact de chimiothérapies sur la réserve de follicules primordiaux (Oktem and Oktay, 2007) ont été étudiés. Mais pour la plupart, le but était d'observer la folliculogénèse chez l'Homme après congélation/décongélation de cortex ovarien et de comparer l'impact de différents protocoles de cryoconservation. Ce modèle est également exploité avec des fragments de cortex d'ovaires adultes (Gook et al., 2001; Gook et al., 2003; Kim et al., 2005; Amorim et al., 2011; Amorim et al., 2012). La conservation de fragments de cortex ovarien est proposée à des femmes avant un traitement potentiellement stérilisant pour tenter de restaurer leur fertilité après greffe ultérieure de ces fragments de cortex. Même si cette technique est encore expérimentale, elle se pratique depuis plus de 10 ans et a permis la naissance 38 enfants à ce jour (pour revue Donnez et al., 2013). Il est donc indispensable d'optimiser les protocoles de cryoconservation de fragments de cortex ovariens postnatal pour offrir les meilleures chances aux patientes (Aubard, 2003; Van Langendonckt et al., 2014). La xenogreffe permet également de mesurer le risque de réintroduction de cellules cancéreuses après greffe (Dolmans et al., 2013).

Depuis les expériences de Polvsen et Skakkebaeck, de rares études commencent à exploiter la xénogreffe pour l'étude du testicule fœtal (Mitchell et al., 2010; Mitchell et al., 2012; Mitchell et al., 2013). Ces études ont pour but d'étudier le développement du testicule et de la lignée germinale mâle chez l'Homme par la xénogreffe de testicules fœtaux âgés de 9 à 18 sg (Mitchell et al., 2010) et l'impact de perturbateurs endocriniens comme les phtalates sur le testicule fœtal (Mitchell et al., 2012; Mitchell et al., 2013). En postnatal, la conservation de tissu testiculaire pouvant être proposée aux petits garçons avant un traitement stérilisant, la xénogreffe peut être un outil intéressant pour étudier la survie du tissu après décongélation et sa capacité à maturer (Sato et al., 2010b).

3.2 Modèle mis au point au laboratoire

La xénogreffe n'avait pas été utilisée, à notre connaissance, pour l'étude du développement précoce de l'ovaire (gonades issues d'IVG). Les gonades obtenues à partir d'IVG sont âgées de moins de 12 sg et la plupart des prélèvements obtenus se situent entre 8 et 10 sg. Les gonades issues d'IMG sont très rares et, en général, obtenues vers 20 sg. La xénogreffe d'ovaires fœtaux humains précoces nous a semblé être un modèle adapté pour comprendre et étudier le développement de l'ovaire fœtal, notamment la période d'entrée en méiose plus massive des ovogonies (vers 12-14 sg). Le modèle a été au préalable caractérisé pour vérifier un développement quasi physiologique de l'organe. Le métabolisme et le système endocrinien de l'hôte ainsi que la technique de greffe pouvant influencer les résultats, mes travaux de recherche ont débuté avec la mise au point de ce modèle au Laboratoire de Développement des Gonades au cours de mon M2.

3.2.1 Mise au point de la greffe

Les premières greffes d'ovaires fœtaux humains ont été réalisées dans le but de tester différents protocoles et choisir celui qui répondait le mieux à nos besoins et contraintes expérimentales. Nous avons cherché à valider un protocole à la fois simple à mettre en application routinière et qui permettait un développement *quasi*-physiologique des ovaires fœtaux greffés ainsi qu'un taux de récupération des greffons satisfaisant. Les critères principaux pour valider notre protocole étaient : un taux de récupération satisfaisant des greffons, une bonne vascularisation, une densité normale des cellules germinales et l'absence d'apoptose ou de nécrose dans l'organe.

Dans un premier temps, seize ovaires fœtaux humains âgés de 6,2 à 10,8 sg (6,2 ; 8,3 ; 8,7 ; 8,7 ; 8,8 ; 9,1 ; 9,1 ; 9,4 ; 9,4 ; 9,6 ; 9,7 ; 9,9 ; 9,9 ; 10,3 ; 10,8 et 10,8 sg) ont été transplantés et 29 souris immunodéficientes femelles non ovariectomisées (4 Nod-scid et 25 Nude) ont été greffées. Dans 7 cas, la greffe a été réalisée en sous-cutané, 19 souris ont été greffées en intra-musculaire et 3 souris à la fois en sous-cutané et en intramusculaire. Les greffes ont duré de 2 à 56 jours et dans 100% des cas au moins un morceau d'ovaire greffé a été récupéré au terme de l'expérience. La récupération successive des greffons nous a permis d'améliorer notre modèle au fur et à mesure des prélèvements. Afin de s'assurer de l'identité des tissus

récupérés, les 2 premiers ovaires greffés (6,2 et 9,4 sg) ont été cultivés en présence de BrdU 0,5% à J1 puis en milieu simple à J2 avant d'être greffés à J3 dans 3 souris (2 Nude et 1 Nod-scid). Des morceaux de chaque ovaire ont été fixés avant greffe et les greffes ont été récupérées au bout de 28 jours. On observe un marquage fort des cellules avant greffe (environ 80% des cellules du tissu). Le marquage persiste après 28 jours de greffe. Les cellules marquées sont moins nombreuses (environ 20%) mais le marquage est exclusivement retrouvé dans les greffons et absent du tissu murin (figure 27A). La culture en présence de BrdU a ensuite été arrêtée car elle constituait une étape supplémentaire superflue dans notre protocole de greffe, les greffons étant facilement reconnaissables dans le tissu murin à l'analyse histologique.

Au cours de la mise au point du protocole nous avons validé :

1. La bonne revascularisation du greffon. Les connexions vasculaires entre le tissu hôte et l'organe humain n'étaient pas observées 2 jours après transplantation (n=1) mais nombreuses dans tous les ovaires transplantés au minimum 15j (figure 27D).

2. Le site de greffe. Nous avons testé la greffe d'ovaire en sous-cutané dans un premier temps car la transplantation des ovaires sous le derme de la souris est un geste simple et peu traumatisant pour l'animal. Les premières greffes ont été réalisées par cette technique (4 ovaires de 6,2 ; 9,4 ; 9,7 et 10,8 sg pour 7 souris greffées). Une densité moyenne d'environ 3000 CG/mm2 (identique à celle d'oavires non greffés d'âge équivalent) a été retrouvée mais le rendement de récupération des greffons (nbre de greffons/nbre de morceaux d'organe greffés) était faible (37,5% en moyenne) même si positif dans 100% des cas. Nous avons ensuite choisi de tester la greffe en intramusculaire avant de passer en capsule rénale, technique largement décrite mais plus invasive. Il a été réalisé 3 greffes (2 ovaires 8,8 et 9,9 sg greffés dans 3 souris Nude) à la fois en sous-cutané et en intra-musculaire pour comparaison. La greffe en intramusculaire a montré une supériorité en terme de rendement moyen de récupération des greffons (83,3%) et taille des organes après greffe. La vascularisation et la densité de CG étaient identiques pour les 2 localisations. Nous avons donc préféré l'abord intra-musculaire.

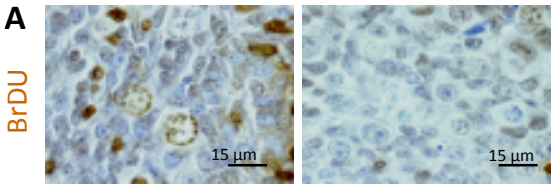
3. Le type de souris receveuse. Il a été testé 2 types de souris hôtes : les souris Nude et les souris Nod-scid. Quatre ovaires ont été utilisés (9,4 ; 9,6 ; 9,7 et 10,8 sg). Chaque ovaire a été coupé en morceaux de tailles égales répartis entre souris Nude et Nod-scid (4 souris Nude et 4 souris Nod/scid). Six greffes en sous-cutané (3 Nude et 3 Nod-scid) et 2 en intra-musculaire

(1 Nude et 1 Nod-scid) ont été réalisées. Pour les 2 types de souris receveuses, le rendement moyen de récupération des greffons a été équivalent (55% pour les Nude et 50% pour les Nod-scid), la vascularisation du greffon et la survie des CG identiques. La densité de CG était équivalente entre les 2 types de souris (en moyenne 3060 CG/mm2 pour les Nude et 3250/mm2 pour les Nod-scid, n=3 pour chaque population) (figure 27C). Compte-tenu des résultats identiques, nous avons préféré utiliser des souris nude chez lesquelles l'absence de poils et la manipulation en atmosphère moins contrôlée simplifiaient le protocole.

4. La taille des greffons. Nous avons dans un premier temps coupé les ovaires en petits morceaux avant la greffe (une dizaine de morceaux d'environ 0,5 mm) afin de limiter l'ischémie des tissus. Les taux de récuperation décevants (inférieur à 30%) nous avons testé pour deux prélèvements suivants (ovaires fœtaux de 10,8 et 9,7 sg), de couper un ovaire en 10 morceaux et l'ovaire contra-latéral en 2. Chaque souris (2 Nude et 2 Nod-scid) a été greffée en sous-cutané avec 1 hémi-ovaire et 5 petits greffons. Au terme de la greffe de 28 jours, tous les hémi-ovaires ont été retrouvés (rendement de 100%). Le rendement moyen de récupération pour les petits greffons était de 28,7%. Dans un des hémi-ovaires greffés, nous avons observé la présence d'une large plaque de nécrose probablement due à une hypoxie du tissu (figure 27B). Par la suite nous avons donc choisi de couper les ovaires en 4 à 5 morceaux de tailles égales. Les greffons étaient alors bien visibles et le rendement de récupération de 92,8%. Aucune nécrose n'a été observée dans les 7 autres greffes de mise au point.

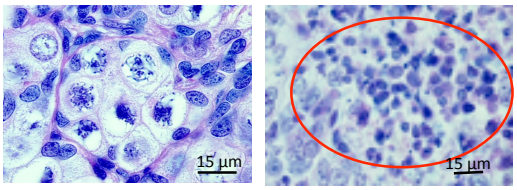
Dans un second temps, nous avons greffé des ovaires à la fois chez une souris Nude femelle non ovariectomisée et chez une souris Nude femelle ovariectomisée pour vérifier que les cycles hormonaux de l'hôte ne perturbaient pas le développement de l'ovaire humain. Nous n'avons pas retrouvé de différence significative de développement de l'ovaire humain en fonction de l'état hormonal de la souris alors que des greffes d'ovaires murins greffés chez des souris ovariectomisées ou non menées parallèlement ont montré une transdifférenciation des ovaires murins greffés chez la souris non ovariectomisée (données personnelles non publiées). Nous avons conclu que le système hormonal murin m'interférait pas sur le développement des greffons humains et choisi de ne pas ovariectomiser les souris receveuses pour éviter un geste chirurgical supplémentaire.

A



Avant greffe Après 4 sem de greffe

B



C

	Nod-scid	Nude
nombre de greffes	4	4
localisation	3 SC/1 IM	3 SC/1 IM
rendement de récupération des greffons	50%	55%
nécrose	1 greffon	0 greffon
apoptose	absence	absence
densité de CG/mm²	3250	3060

D

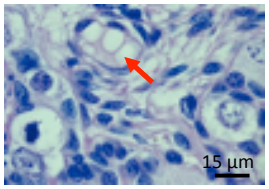


FIGURE 27 : Mise au point du protocole de xénogreffe

A. Marquage immunohistochimique anti-BrDU (kit Amersham, Cell proliferation kit, Biosciences) d'un ovaire de 9,4 SG avant et après 4 semaines de greffe. **B.** La photographie de gauche représente un greffon issu d'un quart d'ovaire de 9,9 SG après 4 semaines de greffe. Le tissu s'est développé correctement. La photographie de droite représente un greffon issu d'un hémi-ovaire de 9,4 SG après 4 semaines de greffe. Le cercle rouge indique une plage de nécrose à l'intérieur du tissu. Coloration hématoxyline-éosine. **C.** Comparaison des paramètres de greffe entre les 2 types de souris receveuses. SC pour sous-cutané, IM pour intra-musculaire. **D**. Coloration hématoxylline-éosine (barre d'échelle=15µm). Le vaisseau sanguin indiqué par la flèche rouge se trouve au milieu du greffon après 28j de greffe.

Il a été choisi après analyse de ces résultats de privilégier le site de greffe en intra-musculaire (meilleur croissance et meilleur rendement), de couper les ovaires en 4 à 8 morceaux selon l'âge (moins de nécrose et meilleur rendement), et d'utiliser les souris Nude (pas de différence de développement ovarien mais absence de poils et conditions d'élevage facilitant l'expérimentation). A ce jour, 70 ovaires fœtaux issus d'IVG ont été greffés dans 116 souris hôtes pour la mise au point du modèle et les besoins expérimentaux.

3.2.2 Protocole de greffe

3.2.1.1 Animaux

Des souris immunodéficientes femelles NMRI :Nu /Nu (Nude) (élevage Janvier, Saint Berthevin, France) non ovariectomisées ont été utilisées pour les transplantations. Les souris ont été élevées dans des cages à couvercle filtrant dans des armoires fermées au sein de notre animalerie selon les normes de la législation française avec un cycle de luminosité 12h/24h, une température constante de 21-23°C et de la nourriture et de l'eau *ad libitum*.

3.2.1.2 Mode opératoire de la greffe

Les ovaires fœtaux (8 à 12 sg) sont coupés en morceaux d'environ 1mm (de 4 à 8 morceaux en fonction de l'âge) selon un axe longitudinal puis transversal afin d'obtenir des morceaux présentant une proportion cortex/médullaire la plus homogène possible.

La souris est anesthésiée à l'isofluorane (Laboratoire Belamont) à 3.5% en phase d'induction, et 2% en phase d'entretien. Une incision sagittale cutanée (environ 1cm) est réalisée dans le haut du dos. Après légère incision des fibres musculaires, les morceaux d'ovaires sont déposés au sein du muscle dorsal à l'aide d'un scalpel émoussé. L'incision cutanée est ensuite refermée à l'aide d'agrafes chirurgicales de 7.5 mm et désinfectée à la povidone iodée.

Après un délai variable post-transplantation, les greffons sont récupérés. Les souris sont euthanasiées par asphyxie au CO_2. La peau est largement découpée autour de la cicatrice de la greffe. Les greffons, visibles à l'œil nu (petite boule blanchâtre de quelques mm, Figure 27), sont fixés pour l'analyse histologique ou congelés dans du tampon RLT pour l'extraction des ARNs.

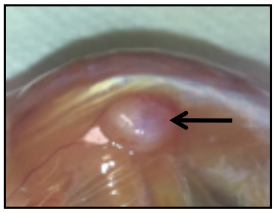


FIGURE 28 : Aspect d'un ovaire fœtal humain après greffe
La flèche désigne un greffon dans le muscle dorsal d'une souris Nude correspondant à un ovaire fœtal humain de 8,4 sg greffé pendant 4 semaines (données personnelles).

3.3 Protocole d'ARN interférence

Il a été décrit l'utilisation de stratégies d'ARN interférence (ARNi) par injection de siRNA (Small interférence RNA) chez des souris greffées avec des cellules tumorales humaines (Delloye-Bourgeois et al., 2009; Landen et al., 2006; Koyanagi et al., 2013). Cette approche expérimentale non réalisable en culture organotypique est facilitée par la bonne vascularisation du greffon et nous avons choisi de l'adapter à notre modèle de greffe d'organe entier.

3.3.1 Choix des siRNA

Nous avons choisi d'inhiber par une strategie d'ARN interférence (ARNi) le gène *doublesex and mab-3 related transcription factor a2* (*DMRTA2)* humain. Plusieurs séquences de Small Interfering RNA (siRNA) sont disponibles sur le site du fournisseur et ont été construites à l'aide du logiciel Rosetta siRNA Design Algorithm (Sigma-Aldrich). La séquence du gène d'intérêt est très conservée chez les vertébrés. Les 3 séquences nucléotidiques de siRNA présentant la meilleure pertinence et la plus grande divergence avec la séquence murine *Dmrta2* (alignement des séquences sur génome et transcriptome humain et murin) ont été commandées chez Sigma-Aldrich ainsi qu'un siRNA contrôle universel élaboré par le fournisseur (détail des séquences dans l'article présenté en « Résultats 1 »).

3.3.2 Validation in vitro des siRNA

Les cellules HEK 293 (lignée de rein embryonnaire humaine) ont été décongelées et cultivées en flasque de 75 cm^2 dans du milieu de culture cellulaire DMEM (Gibco) supplémenté par 15% de sérum de veau fœtal et d'un mélange penicilline-streptomycine. Lorsque les cellules sont à au moins 90% de confluence, elles sont détachées par action de la trypsine (Sigma-Aldrich) et remises en suspension dans une nouvelle flasque. Les cellules sont comptées et diluées pour ensemencer une plaque 12 puits à raison de 80000 cellules dans 1ml de milieu de culture/puits.

La validation de l'efficacité *in vitro* de nos séquences de siRNA a été réalisée sur ces cultures (cellules à 60% de confluence) à la concentration de 110 pmoles par puits (plaques 12 puits, Nunc). La transfection des cellules par les siRNA est facilitée par l'utilisation d'un adjuvant : le jetPRIME ® (Ozyme).

Après 24 heures, le milieu de culture est retiré et 350µl de RNeasy Lysis Buffer (RLT) additionné de 1% de β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich) sont déposés dans les puits. La plaque est ensuite stockée à -20ºC jusqu'à l'extraction des ARNs.

3.3.3 Xénogreffe couplée à une stratégie d'ARN interférence

L'inhibition *in vivo* de la séquence humaine de *DMRTA2* par les 3 séquences de siRNA testées *in vitro* a été réalisée sur des couples de souris femelles Nude. Chaque couple a été greffé avec des morceaux provenant du même ovaire fœtal, une souris étant injectée avec le siRNA contrôle, l'autre avec un mélange des 3 siRNAs dirigés contre *DMRTA2*.

Les injections ont été réalisées quotidiennement par voie intra péritonéale pendant 10 jours, à la dose de 200µg/kg/j (n=5). L'injection intra-pétironéale a été préférée à l'injection sous-cutanés à proximité de l'organe transplanté compte-tenu de la demi-vie très courte des siRNA et de la prise de greffe dans les profondeurs des fibres musculaires. Le lendemain de la dernière injection les souris sont sacrifiées, les greffons récupérés et conservés dans 300µl de RLT à -20ºC ou fixé pour analyse histologique. Le rein étant un tissu connu pour exprimer *Dmrta2*, une partie du cortex rénal de chaque souris est également prélevé pour vérifier que nos séquences de siRNA n'interfèrent pas avec l'expression du gène *Dmrta2* murin chez l'hôte. Une dose forte de 1mg/kg/j de siRNA a été testée mais n'augmentait pas l'efficacité d'inhibition du gène cible et a provoqué une réaction immunitaire forte nous ayant obligé à sacrifié prématurément un couple de souris (n=2).

4. Analyses histologiques

4.1 Fixation des tissus et montage sur lame

Après prélèvement, les tissus sont fixés 3 à 4 heures à température ambiante dans une solution de Bouin (solution d'acide picrique saturée, aldéhyde formique et d'acide acétique, 75/20/5 v/v), soit une nuit à 4ºC dans une solution de formol tamponné à 10%. Après fixation, les tissus sont déshydratés par passage dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (70, 95, 100%) finissant par un bain de butanol toute une nuit. Les tissus sont ensuite inclus dans la paraffine (Paraplast) et coupés en sections de 5µm grâce à un microtome (Leica RM 2135). Celles-ci sont ensuite déposées sur des lames de verre (Superfrost plus, Thermo Scientific). Les coupes de tissus sont déparaffinées et réhydratées grâce à des bains successifs de toluène, d'éthanol de concentrations décroissantes (100, 95, 70%) et d'eau.

4.2 Identification des CG, comptages cellulaires

L'analyse histologique est réalisée après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine grâce à un microscope optique (Olympus BX51) muni d'une platine motorisée et relié à une caméra analogique couleur (3CCD, Sony) couplée au logiciel d'analyse d'image Histolab (Microvision Instruments).

Les CG fœtales sont reconnaissables grâce à des critères morphologiques spécifiques qui sont i) un grand noyau rond ii) un rapport nucléo/cytoplasmique élevé et iii) une membrane plasmique bien délimitée. Les différents stades de prophase I de méiose ont été bien décrits et sont identifiables en histologie par analyse morphologique de la chromatine des CG.

Les comptages ont été réalisés en moyenne sur 3 coupes (montage d'1 coupe sur 20) dans lesquelles toutes les cellules germinales ont été comptées (au minimum 1000 cellules). La densité de CG est calculée en rapportant le nombre de CG comptées par échantillon au nombre de champs pleins comptés et à la surface d'un champ en mm^2.

4.3 Immunohistochimie

Les coupes de tissus sont déparaffinées et réhydratées comme décrit ci-dessus. Les sites antigéniques sont démasqués par action de la chaleur dans un tampon de démasquage approprié. Les lames sont ensuite immergées 15 min dans une solution d'H_2O_2 3% afin d'éliminer l'activité péroxydase endogène tissulaire. Puis les sites de liaison non spécifique de l'anticorps sont saturés dans du sérum bloquant (BSA 5%) pendant 30 min avant incubation des coupes en présence de l'anticorps primaire (2h à 37ºC ou une nuit à 4°C). Les détails concernant les fournisseurs et les dilutions utilisées pour chaque anticorps sont données dans les parties « Résultats » correspondantes. Après rinçage, les coupes sont incubées 30 min à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire conjugué à un polymère à activité péroxydase (ImmPRESS reagent kit, Vector laboratories). La révélation est effectuée en utilisant la DAB (3,3'-Diaminobenzidine tétrahydrochloride, Vector Laboratories) produisant une coloration marron suite à son oxydation par la péroxydase ou en utilisant du VIP (Vector laboratories) produisant une coloration violette.
L'immunomarquage du BrDU ne nécessite aucun démasquage après réhydratation des coupes. L'anticorps primaire déposé en présence de DNAse pour permettre l'accès à l'antigène (1h30 à température ambiante) et l'anticorps secondaire directement couplé à la péroxydase (30 min à température ambiante) sont fournis par le kit Amersham (Cell proliferation kit, Biosciences). La révélation est effectuée à la DAB.
Les cellules germinales marquées et non marquées sont comptées comme décrit ci-dessus (au minimum 200 cellules marquées). Les ovaires fixés immédiatement après isolement utilisés pour les comptages de densité de CG et pour les marquages histochimiques des articles présentés en parties Résultats 1 et 2 sont résumés dans le tableau 5.

5. Analyse d'expression de gènes

5.1 Extraction des ARN et retro-transcription

Les échantillons stockés à -20ºC dans du RLT additionné de 1% de β-mercaptoéthanol sont décongelés et les cellules ou organes lysés (tubes Lysing Matrix, MP-bio adapté à l'appareil FastPrep-24, MP-bio). L'extraction des ARNs des différents échantillons est ensuite réalisée conformément aux recommandations du RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les solutions d'ARNs obtenues (élution finale de 40µL) sont quantifiées par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop ND-1000 (spectrometer, ThermoSientific, Cergy-Pontoise, France).

La transcription inverse (RT) des ARNs natifs en ADN complémentaires (ADNc) s'effectue avec le kit Highcapacity (Applied Biosystems, Grand Island, USA) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ADNc simple brin obtenus sont conservés à -20°C.

Pour l'élaboration d'une banque d'ADNc d'ovaires fœtaux de 6,5 à 28 sg, les ARN totaux ont été amplifiés au cours de la transcription inverse à l'aide du kit QuantiTect Whole Transcriptome cDNA Amplification (Qiagen). Les ovaires utilisés pour l'élaboration de cette banque sont présentés dans le tableau 5.

Age (sg)	Analyses effectuées		
6,4	IHC		
6,5	Banque ADNc amplifié		
6,8	Banque ADNc amplifié		
6,9	IHC		
6,9	Banque ADNc amplifié		
7	IHC		
7,3	Banque ADNc amplifié	IHC	
7,6	Banque ADNc amplifié		
7,8	IHC		
7,9	Banque ADNc amplifié		
8,5	IHC validation greffe		
8,6	IHC		
8,6	Banque ADNc amplifié	IHC	
8,8	Banque ADNc amplifié		
9,1	IHC		
9,4	IHC validation greffe		
9,5	IHC		
9,6	IHC validation greffe		
9,8	IHC		
10	IHC	IHC validation greffe	
10	Banque ADNc amplifié		
10,1	Banque ADNc amplifié		
10,9	IHC		
11	Banque ADNc amplifié	IHC	IHC validation greffe
11	Banque ADNc amplifié	IHC	
11	Banque ADNc amplifié	IHC validation greffe	
12	IHC validation greffe		
14,5	Banque ADNc amplifié	IHC	IHC validation greffe
17	Banque ADNc amplifié	IHC	IHC validation greffe
22	Banque ADNc amplifié	IHC	IHC validation greffe
22,5	IHC		
23	IHC		
25	IHC		
25	IHC		
25	IHC		
27	Banque ADNc amplifié	IHC	
28	IHC		
30	IHC		
30	IHC		
31	IHC		
35	IHC		

TABLEAU 5 : Ovaires fœtaux utilisés en histologie et biologie moléculaire

Ce tableau dénombre les ovaires fœtaux (6,5 à 27 sg) utilisés pour élaborer la banque d'ADNc (surlignés en rose) et pour réaliser les comptages cellulaires et les immunohistochimies présentés en résultats 1 et 2 du manuscrit. « IHC validation greffe », bleu correspond aux ovaires fixés après isolement ayant servi comme point de comparaison pour la validation du modèle de greffe ; « IHC », jaune correspond aux ovaires ayant servi à la mise en évidence de cellules mitotiques persistantes dans l'ovaire fœtal humain. La délimitation rouge marque la limite entre les ovaires issus d'IVG (en haut) et ceux issus d'IMG (en bas).

5.2 PCR quantitative

Les transcrits sont quantifiés par transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (RT-qPCR). La RT-qPCR permet la quantification d'ARNm d'intérêt dans nos échantillons relativement à l'expression d'un gène de référence. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN double brin est quantifiée grâce à l'incorporation d'une molécule fluorescente.

Deux types d'amorces ont été utilisés dans ces travaux : une partie dessinée en utilisant le logiciel *Primer Express* et synthétisée par Eurogentec pour une utilisation avec une sonde sybergreen, l'autre partie a été obtenue auprès d'Applied Biosystems pour une utilisation avec une sonde TaqMan. Dans le cas des amorces dessinées par Eurogentec, l'efficacité de chaque couple est testée sur une gamme de concentration d'échantillon d'ADNc afin de s'assurer qu'elle est comprise entre 95 et 105%, puis les produits d'amplification sont déposés sur gel d'agarose pour vérifier la spécificité de la réaction (un seul produit d'amplification).

L'amplification est effectuée dans une plaque 96 puits (Microamp, Applied Biosystems). Chaque puits est chargé avec 9µL d'ADNc dilué, 12,5µl de mix (Power Sybergreen ou Taqman Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems) et 400nM d'amorces pour un volume total de 25µl. L'amplification s'effectue dans un thermocycleur (7900HT, Applied Biosystems) durant 40 cycles. Toutes les amplifications sont réalisées en duplicats et l'efficacité de chaque q-PCR est déterminée grâce à la réalisation d'une gamme d'ADNc réalisée sur 5 log. L'expression du gène est rapportée à l'expression contrôle d'un gène rapporteur. Lors de l'analyse des greffons, le gène de la Cyclophiline A/peptidylprolyl isomérase A (*PPIA*) a été choisi et les amorces testées chez l'humain et chez la souris pour vérifier la spécificité d'espèce de notre gène de référence. Les résultats sont exprimés en delta de CT et rapportés au pourcentage du maximum.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Les travaux constituant ce manuscrit se sont orientés selon trois axes :

i) Caractériser la lignée germinale femelle humaine à différents stades du développement fœtal. De manière étonnante, le développement de ces cellules a fait l'objet de peu d'études et demeure mal compris. Par exemple, si le moment auquel les premières cellules entrent en méiose a été caractérisé, les données décrivant si toutes les cellules entrent en méiose et la proportion de ces cellules pouvant aboutir au final à un ovocyte compétent (en quelque sorte le potentiel fertilité de la femme) ne sont pas claires.

ii) Améliorer nos connaissances sur les mécanismes moléculaires en jeu chez l'Homme dans la différenciation de la lignée germinale. Il a été choisi de focaliser nos recherches sur la période de transition mitose-/méiose. Effectivement, à ce jour, toutes les voies de signalisation identifiées proviennent du modèle murin mais leur existence et fonctionnalité chez l'être humain demeurent sujette à caution.

iii) Etudier la potentielle perturbation de ces mécanismes par une approche toxicologique. Nous avons ainsi étudié les effets d'un glucocorticoïde utilisé dans un cadre thérapeutique chez la femme enceinte, la dexméthasone sur la mise en place de la lignée germinale dans l'ovaire fœtal humain. Ce stéroïde nous est apparu particulièrement inquiétant car utilisé au cours de la grossesse et incriminé comme potentiellement nocif chez le rat. Une étude toxicologique *in vitro* permet d'appréhender les effets sur le développement ovarien humain d'un xénobiotique avant que les études épidémiologiques ne révèlent ces effets 20 à 30 ans plus tard.

Ces travaux ont été principalement réalisés sur du matériel humain, modèle central de ces études et analysés par des techniques d'histologie (himmunohistochimie et comptage cellulaires) et de biologie moléculaires (RT-pPCR). Le recours au modèle murin a parfois été nécessaire pour valider en amont l'orientation de nos recherches ou comparer le développement chez deux mammifères différents. L'accès plus facile des tissus murins avait permis au Laboratoire, préalablement à mes travaux de recherche, de réaliser entre autres un transcriptome sur cellules germinales triées avant et pendant l'initiation de la méiose pour cibler de nouveaux gènes d'intérêt pour cette période.

Les tissus humains ont été exploités soit immédiatement après isolement, soit après culture organotypique en conditions variables, soit après transplantation chez la souris

immunodéficiente. L'accès aux prélèvement fœtaux humains est cependant difficile, surtout à la période d'initiation de la méiose sur laquelle nous avons souhaité centrer nos recherches. Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre au cours de ces travaux pour palier au manque de matériel et seront détaillées dans les résultats. Une banque d'ADNc amplifiés d'ovaires et testicules fœtaux du 1er au 3ème trimestre de gestation avait déjà été réalisée par le Professeur Nelly Achour-Frydman avant mon arrivée au Laboratoire. Ce matériel a permis, au cours de cette thèse. de screener l'expression de différents marqueurs ciblés en fonction du stade de développement et du sexe sans avoir à attendre de nouveaux prélèvements. La culture organotypique, depuis longtemps utilisée au Laboratoire, nous permet ensuite de tester la fonctionnalité dans l'ovaire fœtal des voies de signalisation cibles de ces marqueurs exprimés. Enfin, la mise au point d'un modèle de xénogreffe d'ovaires fœtaux au cours de mon M2 nous a permis, en le couplant à une stratégie d'ARN interférence, d'en faire un véritable modèle de génétique fonctionnel chez l'Homme pour une partie de ces travaux. Par ces approches expérimentales, des marqueurs des CG à différents stades du développement (CG post-migratoires, ovogonies, ovocytes) ont été analysés. Il est important de mieux caractériser les cellules germinales pour pouvoir les isoler, comprendre leur différenciation et leur perturbation et pouvoir à terme répondre à des questions essentielles comme la possibilité d'une néo-ovogénèse chez la femme et la restauration potentielle de la fertilité. Les mécanismes impliqués dans la transition mitose/méiose et dictant aux CG si elles initient la méiose ou si elles restent à l'état « souche » sont très peu décrits chez l'Homme. Nous avons trouvé important de vérifier si les mécanismes décrits chez la souris étaient conservés chez l'Homme ou si d'importantes différences étaient observées. Une non-conservation ou un fonctionnement différent des vois connus chez la souris renforcerait l'importance des travaux réalisés sur l'humain pour la compréhension fondamentale et pour l'application clinique ultérieure. L'étude fondamentale des mécanismes de mise en place de la lignée germinale dans l'ovaire fœtal humain permet également de mieux en étudier ses perturbations et pouvoir, à terme, prévenir de certaines infertilités.

Les résultats de ces différentes études seront présentés dans la suite du manuscrit sous forme d'articles scientifiques qui seront ensuite discutés dans la partie « Discussion générale ».

RESULTAT 1:

Modèle de xénogreffe, étude de la transition mitose/méiose

molecular human reproduction ORIGINAL RESEARCH

Involvement of doublesex and mab-3 related transcription factors (DMRTs) in human female germ cell development demonstrated by xenograft and interference RNA strategies

Poulain M, Frydman N, Tourpin S, Souquet B, Muczynski V, Benachi A, Habert R, Rouiller-Fabre V, Livera G

MHR 2014, doi: 10.1093/molehr/gau058

Avant d'initier ce projet, un transcriptome avait été réalisé au LDG sur des CG murines triées mâles et femelles. Les CG avaient été isolées par Magnetic activated cell sorting (MACS) sur le marqueur SSEA1 dans des gonades fœtales murines à 12,5 et 13,5 jpc. Ce transcriptome a permis de mettre en évidence plusieurs dizaines de gènes spécifiquement exprimés dans l'ovaire au moment de l'entrée en méiose. Certains gènes déjà décrits pour leur rôle dans la transition mitose/méiose comme *Stra8* ou les *Msx* étaient différentiellement exprimés. D'autres gènes candidats présentaient un profil d'expression intéressant. C'était le cas de *Dmrta2*, plus fortement exprimé dans les CG femelles à 13,5 jpc. Nous avons choisi de nous focaliser sur l'étude de ce gène du fait de sa haute conservation au cours de l'évolution et du rôle des autres membres de sa famille dans les processus de détermination sexuelle chez de nombreux vertébrés et invertébrés.

Dmrta2 appartient à la famille des *Doublesex and mab-3 related transcription factors* (Dmrt). Cette famille est composée de huit membres chez la souris et l'Homme (Ottolenghi et al., 2002; Kim et al., 2003b; Volff et al., 2003). Les gènes *Dmrt1, Dmrt2, Dmrt3, Dmrt4/Dmrta1, Dmrt5/Dmrta2, Dmrt6/Dmrtb1, Dmrt7/Dmrtc2* et *Dmrt8* codent pour des facteurs de transcription à domaine DM très conservés entre les espèces. C'est un motif de liaison à l'ADN de type doigt de zinc atypique initialement identifié dans le gène *doublesex* (*dsx*) de *Drosophila melanogaster* (Erdman and Burtis, 1993) puis retrouvé dans le gène *male abnormal 3* (*mab-3*) de *Caenorhabditis elegans* (Raymond et al., 1998). Chez la drosophile, les *dsx* sont exprimés chez le mâle et la femelle et contrôlent de manière « sexe-spécifique » le développement des organes sexuels, la production de phéromones et le comportement sexuel (Taylor and Truman, 1992; Villella and Hall, 1996; Waterbury et al., 1999). Chez le nématode, *Mab-3* n'est exprimé que chez le mâle et est requis pour le développement d'organes sensoriels nécessaires à l'accouplement et pour certains aspects comportementaux au cours de l'accouplement (Shen and Hodgkin, 1988; Yi et al., 2000). Les protéines DMRT se lient à l'ADN sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères avec d'autres protéines à domaine DM (Murphy et al., 2007).

La plupart des *Dmrt* sont exprimés dans les gonades chez les vertébrés. C'est pourquoi leur rôle dans la différenciation sexuelle et plus récemment dans la détermination du sexe a été étudié (pour revue Zarkower, 2013). Il a été démontré que *Dmrt1* et *Dmrt7* jouent un rôle particulièrement important dans les gonades. Le rôle de Dmrt1 dans la différenciation sexuelle gonadique et le maintien du phénotype mâle (Raymond et al., 2000; Matson et al., 2011), dans la survie des CG (Kim et al., 2007a) et dans la différenciation des CG a été

présenté en introduction de ce manuscrit (Matson et al., 2010). Il a été également exposé que, dans les CG femelles, *Dmrt1* joue un rôle dans l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose (Krentz et al., 2011). Chez l'Homme, des délétions dans la région 9p du chromosome 9, où *DMRT1*, *DMRT2* et *DMRT3* sont localisés, sont associées à des défauts de différenciation testiculaire (Raymond et al., 1999; Ogata et al., 2001). Il est également suspecté un rôle de *DMRT1* plus précocement dans la détermination sexuelle chez l'Homme, comme il l'a été décrit chez les oiseaux (Smith et al., 2009). *Dmrt7* est, quant à lui, principalement détecté dans les spermatocytes au stade de pachytène et serait impliqué dans la progression méiotique chez le mâle (Kim et al., 2007b). *Dmrt2* jouerait un rôle dans la myogenèse (Sato et al., 2010a). *Dmrt3, Dmrt4* et *Dmrt5* appartiennent à la même sous-famille des *Dmrt* contenant un motif DMA très conservé et sont exprimés dans le système nerveux en formation et lors de la mise en place de la placode olfactive (Huang et al., 2005; Gennet et al., 2011; Parlier et al., 2013).

A l'initiation du projet, seule une publication rapportait l'expression de *Dmrta2/Dmrt5* dans les gonades fœtales murines. Il ressortait d'analyses PCR publiées que ce gène était plus fortement exprimé dans les ovaires que dans les testicules fœtaux (Kim et al., 2003a). Ces résultats ont été confirmés au laboratoire par RT-qPCR dans des gonades fœtales et post-natales murines chez le mâle et la femelle. Nous avons retrouvé l'expression de *Dmrta2* principalement dans les ovaires fœtaux au moment de l'entrée en méiose des CG (13,5 et 14,5 jpc). Ce profil d'expression renforçait notre intérêt pour ce gène. Dans notre analyse transcriptomique, d'autres membres de la famille des DMRT, présentaient un profil d'expression intéressant pour la période de transition mitose/méiose. Même si le différentiel d'expression CG indifférenciées/ CG différenciées était plus faible que celui observé pour *Dmrta2*, il semblait pertinent d'étudier leurs profils d'expressions. L'expression de *Dmrt4/Dmrta1* et *Dmrt7/Dmrtc2* avait été décrite comme plus forte dans les ovaires que dans les testicules fœtaux à 13,5 jpc (Kim et al., 2003a). Nous avons confirmé ce résultat et nous avons décrit pour la première fois l'expression de *Dmrt6/Dmrtb1* dans les ovaires fœtaux. Les CG d'ovaires de souris *Oct4*-GFP à 13,5 jpc ont été isolées des cellules somatiques par Fluorescent activated cell sorting (FACS) et il a pu être montré que l'expression de *Dmrta2, Dmrtb1* et *Dmrtc2* était exclusivement germinale dans les ovaires fœtaux alors que l'expression de *Dmrta1* était plutôt somatique.

Nous avons ensuite investigué l'expression des huit *DMRT* dans des gonades fœtales humaines du 1er et 2nd trimestre. Cette étude a permis de décrire pour la première fois

l'expression de *DMRTA2* dans l'ovaire humain. *DMRTA2*, *DMRTB1* et *DMRTC2* présentaient un profil d'expression similaire à celui de *STRA8* et ont donc attiré notre attention. Nous avons exposé en introduction que même si les premières CG initient la méiose vers 10-11 sg, la plupart des CG entrent en méiose vers 14 sg chez l'Homme. Très peu de matériel d'étude est disponible à cet âge du fait du délai légal d'IVG à 12 sg et l'accès difficile aux IMG. La culture organotypique ne nous permet pas d'étudier les organes cultivés sur un long terme. Nous avons donc développé au LDG un modèle de xénogreffe d'ovaires fœtaux humains dans le muscle dorsal de souris immunodéficientes. Le modèle a été caractérisé dans un premier temps pour vérifier qu'il permettait un développement des ovaires fœtaux greffés similaire à celui d'ovaires non greffés d'âges équivalents en terme de densité et d'expression de marqueurs de différenciation des CG. Après optimisation et validation, ce modèle de xénogreffe a été couplé avec une stratégie d'ARN interférence (ARNi) pour inhiber spécifiquement l'expression d'un gène humain sans interférer avec la souris hôte. A notre connaissance, cette étude relate pour la première fois une stratégie d'ARNi sur organe humain entier. Nous avons choisi d'inhiber dans un premier temps le gène *DMRTA2* car il présentait dans le transcriptome murin le profil le plus pertinent pour un potentiel rôle dans la transition mitose/méiose. Une première description de ce gène dans l'ovaire humain rendait également l'étude de son rôle plus approfondie stimulante. Cette stratégie nous a permis de mettre en évidence la contribution de *DMRTA2* dans le développement de la lignée germinale. *DMRTA2* semblerait requis pour l'acquisition de facteurs intrinsèques nécessaires à la progression des CG dans leur différenciation. De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de *DMRTA2* entrainait une diminution de l'expression des deux autres *DMRT* présentant un profil d'expression intéressant : *DMRTB1* et *DMRTC2*. Il avait été vérifié préalablement que les siRNA ne s'alignaient pas sur les séquences des transcrits de ces gènes. Nous avons voulu reproduire notre stratégie d'ARNi avec des siRNA dirigés contre les séquences humaines de *DMRTB1* et *DMRTC2* pour étudier le lien entre ces trois *DMRT* dans la régulation de la différenciation méiotique. Les premiers résultats histologiques obtenus supputaient une diminution du nombre de CG méiotiques chez les souris traitées par ces siRNA mais nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence par RT-pPCR d'inhibition de l'expression des gènes testés malgré plusieurs changements de protocole d'injection. Ces résultats n'ont pu être intégrés au papier et seront discutés dans la partie discussion générale.

Molecular Human Reproduction, Vol. 0, No. 0, pp. 1–12, 2014
Mol. Hum. Reprod. Advance Access published August 14, 2014
doi:10.1093/molehr/gau058

molecular human reproduction

ORIGINAL RESEARCH

Involvement of doublesex and mab-3-related transcription factors in human female germ cell development demonstrated by xenograft and interference RNA strategies

Marine Poulain[1,2,3,4,5], Nelly Frydman[1,2,3,4,5], Sophie Tourpin[1,2,3,4], Vincent Mucsynski[1,2,3,4], Benoit Souquet[1,2,3,4], Alexandra Benachi[6], René Habert[1,2,3,4], Virginie Rouiller-Fabre[1,2,3,4], and Gabriel Livera[1,2,3,4,*]

[1]University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratory of Development of the Gonads, Unit of Stem Cells and Radiation, UMR 967, Fontenay aux Roses F-92265, France [2]CEA, DSV, iRCM, SCSR, LDG, Fontenay aux Roses F-92265, France [3]INSERM, Unité 967, Fontenay aux Roses F-92265, France [4]University Paris-Sud, UMR 967, Fontenay aux Roses F-92265, France [5]AP-HP, University Paris-Sud, Reproductive Biology Unit, Clamart F-92140, France [6]AP-HP, University Paris-Sud, Department of Obstetrics and Gynecology, Clamart F-92140, France

*Correspondence address. Laboratoire de Développement des Gonades, CEA, 18, route du Panorama – BP 6, 92265 Fontenay-aux-Roses cedex, France. Tel: +33146549912; E-mail: gabriel.livera@cea.fr

Submitted on March 28, 2014; resubmitted on July 19, 2014; accepted on July 24, 2014

ABSTRACT: We identified three doublesex and mab-3-related transcription factors (*DMRT*) that were sexually differentially expressed in human fetal gonads and present in the ovaries at the time of meiotic initiation. These were also identified in murine embryonic female germ cells. Among these, we focused on *DMRTA2 (DMRT5)*, whose function is unknown in the developing gonads, and clarified its role in human female fetal germ cells, using an original xenograft model. Early human fetal ovaries (8–11 weeks post-fertilization) were grafted into nude mice. Grafted ovaries developed normally, with no apparent overt changes, when compared with ungrafted ovaries at equivalent developmental stages. Appropriate germ cell density, mitotic/meiotic transition, markers of meiotic progression and follicle formation were evident. Four weeks after grafting, mice were treated with siRNA, specifically targeting human *DMRTA2* mRNA. *DMRTA2* inhibition triggered an increase in undifferentiated FUT4-positive germ cells and a decrease in the percentage of meiotic γH2AX-positive germ cells, when compared with mice that were injected with control siRNA. Interestingly, the expression of markers associated with pre-meiotic germ cell differentiation was also impaired, as was the expression of *DMRTB1 (DMRT6)* and *DMRTC2 (DMRT7)*. This study reveals, for the first time, the requirement of *DMRTA2* for normal human female embryonic germ cell development. *DMRTA2* appears to be necessary for proper differentiation of oogonia, prior to entry into meiosis, in the human species. Additionally, we developed a new model of organ xenografting, coupled with RNA interference, which provides a useful tool for genetic investigations of human germline development.

Key words: DMRT / human germ line / ovary development / siRNA / xenograft

Introduction

In mammals, female reproductive potential is dictated in part, by the proper development of the germline during fetal life. Indeed in the fetal ovary, germ cells, also termed oogonia, initially proliferate very actively before entering into meiosis to make up the definitive pool of non-renewable oocytes that will sustain female fertility throughout adulthood (Mamsen *et al.*, 2011). This crucial step occurs only once during the female lifespan. Most of our knowledge of the mechanisms that sustain the development of germ cells arises from murine studies, and little is known about such mechanisms in larger mammals, including humans. Interestingly, the development of the human fetal ovary appears to be a much slower process than that of the mouse, requiring several weeks instead of a few days. Moreover, the human cycle is asynchronous, featuring the co-existence of germ cells at various stages of differentiation (i.e. oogonia, oocytes and follicles). In human fetal gonads, primordial germ cells (PGCs) colonize the genital anlage between the end of the fifth and sixth weeks post-fertilization (wpf) (Motta *et al.*, 1997).

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

The PGCs then differentiate into oogonia, with only proliferating oogonia being observed until around 10 wpf. At 11 wpf, the first signs of meiosis initiation become apparent and later, somatic cells organize into cellular cordlike structures, which envelope nests of germ cells within the cortical zones (Motta *et al.*, 1997; Le Bouffant *et al.*, 2010; Childs *et al.*, 2011). While increasing numbers of germ cells initiate meiosis, a pool of oogonia carry on proliferating until at least 16–20 wpf. At around 20 wpf, some oocytes become enclosed into primordial follicles (Francavilla *et al.*, 1990). As in the mouse model, in humans, germ cell differentiation is a gradual process, as demonstrated by the progression of marker expression from oogonia to primordial follicles (Stoop *et al.*, 2005). PGCs first express pluripotent stem cell markers such as NANOG, FUT4/SSEA1 or POU5F1/OCT4, when they reach the genital ridge (Kerr *et al.*, 2008). Oogonia gradually progress from their undifferentiated state and express the germ cell lineage marker DDX4. Simultaneously they acquire the ability to initiate sexual differentiation and enter meiosis, as evidenced through *DAZL* expression (Anderson *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008). The expression of the meiosis gatekeeper *STRA8* can be detected shortly thereafter (Le Bouffant *et al.*, 2010; Childs *et al.*, 2011). During the course of oogonia differentiation and before meiotic entry, germ cells loose the expression of the stem cell markers (Kerr *et al.*, 2008).

The *doublesex (dsx) and male abnormal-3 (mab-3) related transcription factor* (*DMRT*) gene family consists of 8 member genes, which are conserved among vertebrates and widely involved in developmental processes including somitogenesis, nervous system development and gonadal differentiation (Zarkower, 2013). Interestingly, *Dmrt1*, the most well-known member of this family, has recently been identified as being involved in regulating male fetal germ cell proliferation and pluripotency, and controlling the mitosis/meiosis decision in adult mouse spermatogonia (Raymond *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2007a; Krentz *et al.*, 2009; Matson *et al.*, 2010; Matson and Zarkower, 2012). In the mouse ovary, *Dmrt1* has been shown to directly activate the transcription of *Stra8* (Krentz *et al.*, 2011). In humans, *DMRT1* is expressed in male and female fetal gonads and adult testes (Jorgensen *et al.*, 2012), and loss of *DMRT1* has been proposed as being associated with sex reversal, gonadal failure and testicular germ cell tumors (Bennett *et al.*, 1993; Lopes *et al.*, 2013; Quinonez *et al.*, 2013). However, its role in human fertility remains poorly understood.

It has been demonstrated that other members of the DMRT family are involved in organogenesis, including gametogenesis; *Dmrta1* (*Dmrt4*) appears to play a role in folliculogenesis (Balciuniene *et al.*, 2006), *Dmrtb1* (*Dmrt6*) expression is essential during meiotic prophase I of spermatogonia (Zarkower, 2013) and *Dmrtc2* (*Dmrt7*) purportedly plays a role in the recruitment of chromatin marks to the sex chromosomes (Kim *et al.*, 2007b). However, to date *Dmrta2* (*Dmrt5*) has only been shown to be involved in central nervous system development (Guo *et al.*, 2004; Konno *et al.*, 2012; Saulnier *et al.*, 2013), despite expression being demonstrated in murine fetal ovaries and adult testes (Kim *et al.*, 2003).

To understand better the role of the DM domain gene family in human gonad development, we investigated the expression of these genes. *DMRTA2 (DMRT5)* expression was well correlated with meiosis initiation. In order to explore its role during the mitotic/meiotic transition, we developed an original model of xenografted human fetal ovaries in immunodeficient mice, coupled with RNA interference.

Materials and Methods

Experimental animals

All animal studies were conducted in accordance with the French Ministry of Agriculture guidelines for the care and use of laboratory animals. NMRI (Naval Maritime Research Institute) mice were used to harvest gonads at various developmental stages as previously described (Guerquin *et al.*, 2010). The Pou5f1-GFP mouse model, used for cell sorting, was previously described (Yoshimizu *et al.*, 1999). Female immunodeficient NMRI:Nu/Nu mice, 6–8 weeks old, were used as recipient animals for xenografts.

Collection of murine gonads

Fetal and postnatal murine gonads were harvested from fetal stage 11.5 days post conception (dpc) until adulthood (60 days post-partum (dpp)). Males were caged with females overnight, and the presence of vaginal plug was examined the following morning. Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation and their fetuses were removed from uterine horns. The sex of gonads before 12.5 dpc was determined by PCR amplification of *Sry* as previously described (Petre-lazar *et al.*, 2007). For fetal stages each sample represents a pool of 3–8 gonads. Apart for the adult gonads, all observations of postnatal stages were made on pools of three gonads. At 60 dpp the ovary was used as a whole and one-fourth of the testis was used. All tissues were stored at −20°C in lysis buffer (Buffer RLT®, guanidine thiocyanate buffer, RNeasy mini-kit, Qiagen Courtaboeuf, France) immediately after harvesting.

Collection of human fetal gonads

Human fetal ovaries were harvested from material obtained following legally induced abortions, carried out during the first trimester of pregnancy, or therapeutic terminations, carried out during the second or third trimesters of pregnancy, i.e. from 6 to 22 wpf. The operations were done in the Department of Obstetrics and Gynecology at the Antoine Béclère Hospital, Clamart (France) as previously described (Guerquin *et al.*, 2009; Le Bouffant *et al.*, 2010). Fetal age was calculated by measuring the length of limbs and feet according to the mathematical model developed by Evtouchenko *et al.* (1996) and none of the induced abortions were done for reasons of fetal abnormality. Fetal ovaries from the therapeutic termination of pregnancies (from 12 to 22 wpf) had to display normal histological features before they were included in the study. Our study was approved by the Biomedicine Agency (number PFS12-002) and all women gave their informed consent.

Xenograft protocol

Each pair of ovaries, obtained from legally aborted fetuses, was cut into four pieces each before being grafted into female immunodeficient mice. Four pieces were selected randomly and transplanted into control and treated recipient mice. Isoflurane gas inhalation anesthesia was used during the grafting protocol. Following experiments, performed to identify the best grafting site, sub-cutaneous grafting and grafting into the kidney capsule (Abir *et al.*, 2003; Hernandez-Fonseca *et al.*, 2004) were found to complicate the harvesting of healthy grafted tissues. Ultimately based on reduced surgery invasiveness, efficient graft recovery, and adequate angiogenesis, grafting into the back muscle, as previously described with adult human ovaries (Soleimani *et al.*, 2008), was favored. Thus, for each mouse, four pieces were inserted into the back muscle, ~10 mm away from the incision site, using fine curved Vannas scissors (Moria, France) to make a 3–5-mm deep incision. Finally, body wall and skin incisions were closed. All procedures were performed under aseptic conditions.

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

In vivo RNA interference protocol

Synthetic HPLC purified siRNAs (sense and antisense strands) were purchased from Sigma-Aldrich (Evry, France). SiRNAs were chosen from a pre-designed bank of siRNA, designed using the Rosetta-powered siRNA design algorithm (Rosetta Inpharmatics) and were blasted to verify that they did not match any other sequences, including murine Dmrta2 (Dmrt5) (Supplementary data, Fig. S4B) or other human DMRTs notably DMRTB1 (DMRT6) and DMRTC2 (DMRT7) (data not shown). Sequences are shown in Table I. The efficiency of each siRNA alone, and that of a mixture, composed of all three siRNAs was verified using HEK293 cells, a human kidney cell line expressing *DMRTA2 (DMRT5)* (Supplementary data, Fig. S4A). Five pairs of fetal human ovaries (9.4, 9.9, 10.0, 10.3 and 10.8 wpf) were grafted into nude mice and peritoneal injections were initiated 4 weeks after, to target the meiosis initiation window. For each pair of ovaries, two recipient animals were grafted and received daily injections of an siRNA universal negative control (Mission® siRNA Universal negative Control, Sigma-Aldrich, Evry, France) or a mixture of three siRNAs, specifically targeting the human sequence of *DMRTA2 (DMRT5)*. Preliminary experiments were performed to compare the effect of siRNA injections as a function of dose (6 or 30 μg/kg/day) and treatment duration (3 or 10 days). Higher doses (30 μg/kg/day) were found to generate immune systemic reactions in some recipient mice ($n = 2$). Mice were immediately sacrificed to avoid suffering (third day). Real-time quantitative PCR (RT–qPCR) analysis indicated robust inhibition of *DMRTA2 (DMRT5)*. The dose of 6 μg/kg/day, over a period of 10 days was eventually defined as being efficient, while generating no adverse systemic reactions. Twenty-four hours after the last injection, animals were sacrificed and grafts were recovered for histological and immunohistochemical analyses or gene expression studies.

Histology and immunohistochemistry

After collection, human ovary grafts were fixed in Bouin's fluid or 10% neutral formalin. The fixed tissues were dehydrated, embedded in paraffin and cut into 5 μm-thick sections.

For histology, sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Germ cells on each section were identified on the basis of their histological features, as previously described (Guerquin *et al.*, 2010; Poulain *et al.*, 2012). Normalization was achieved by dividing the number of germ cells (at least 1000 cells counted) in each fragment by the area, to obtain a germ cell density.

Immunohistochemistry was performed using commercially available primary antibodies: anti-FUT4 (1/100, MC 480 Cell Signaling, Saint Quentin en Yvelines, France), anti-γH2AX antibody (1/500, Euromedex, Mundolsheim, France), anti-cleaved caspase-3 antibody (1/100, ASP175 Cell signaling, Saint Quentin en Yvelines, France), anti-pan-TP63 antibody (1/100 4A4, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-DDX4 antibody (1/500, Abcam, Cambridge, UK), anti-POU5F1 antibody (1/200, Santa Cruz Biotechnology) and anti-PCNA (1/10 000, PC10, Abcam,), as previously described (Le ouffant *et al.*, 2010; Poulain *et al.*, 2012). DNA fragmentation was detected by terminal dUTP nick-end labeling (TUNEL) of DNA (ApopTag® Peroxidase *in situ* apoptosis detection kit, S7100, Millipore, France). Germ cells were counted in sections distributed along the graft (at least 1000 stained and/or unstained germ cells), using Histolab software (Microvision Instruments, Evry, France).

Table I *DMRTA2* siRNA sequences.

SASI_Hs02_00359300 5′-CCUACGAGGUCUUCGGUUC-3′
SASI_Hs02_00359301 5′-CGGUUCAGAGGCUGACAAA-3′
SASI_Hs02_00359299 5′-GCCUGUACGGGCCUAUGGU-3′

Murine germ cell sorting

Germ cells were purified by flow cytometry (fluorescence activated cell sorter) (Beckman Coulter, Brea, CA, USA; MoFlo) using a pool of 13.5 dpc ovaries from Oct4-GFP mice, crossed with the NRMI mouse strain (Yoshimizu *et al.*, 1999) as previously described (Souquet *et al.*, 2012).

Real-time quantitative PCR

The total RNA from grafted and ungrafted ovarian pieces, murine fetal and post-natal gonads, sorted Oct-4 positive and negative cells and HEK293 cell cultures were extracted using the RNeasy mini-kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and reverse transcription was carried out with the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions.

In order to measure the expression of multiple genes during human gonadal development, total RNA from fetal ovaries and testes were also extracted using the RNeasy mini-kit (Qiagen Courtaboeuf, France), followed by a reverse transcription and whole transcriptome amplification (Quantitect whole transcriptome cDNA Amplification, Qiagen, Coutaboeuf, France). A single ovary was used for 14.5, 17.0 and 21.8 wpf and a single testis for 6, 7.9 and 9.6 wpf. RNA from similarly aged gonads were pooled: for the ovaries a first pool was constituted with 6.5; 6.8 and 6.9 wpf leading to an estimated age of 6.7 wpf, the second was 7.9; 7.6 and 7.3 wpf (estimated age of 7.6 wpf); the third was 8.8 and 8.6 wpf (estimated age of 8.7 wpf); the fourth was 10.1 and 10.0 wpf (estimated age of 10.1 wpf). The fifth was a pool of three different ovaries aged of 11.0 wpf. For the testes the pool was constituted with 10.6 and 11.0 wpf (estimated age of 10.8 wpf).

The 7900HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) and SYBR-green or Taqman labeling were used for quantitative RT–PCR (RT–qPCR). The comparative ΔΔcycle threshold method was used to determine the relative quantities of mRNA using ACTB (β-actin) or PPIA (cyclophilin A) mRNA as endogenous reporters. Results are presented as a percentage of the maximum (i.e. the highest expression is defined as 100%). Each RNA sample was analyzed in duplicate. The sequences of oligonucleotides used with SYBR-green detection were designed with Primer express Software (Table II).

Statistical analysis

Each data point represents the mean ± SEM of a minimum of at least three independent experiments. Data were analyzed using either ANOVA or Student's *t*-test. *P*-values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

DMRT expression in human fetal gonads

Human fetal gonads from the first and second trimesters of pregnancy were grouped according to developmental stage (ovaries ranging from a mean age of 6.7–21.8 wpf and testes ranging from a mean age of 6–10.8 wpf), and the expression profiles of the eight DMRT members were determined by RT–qPCR (Fig. 1). No obvious change in the expression patterns throughout development was observed for *DMRT1*, *DMRTA1 (DMRT4)* and *DMRTC1 (DMRT8)* neither as a function of sex, nor age. *DMRT2*, *DMRT3*, *DMRTA2 (DMRT5)*, *DMRTB1 (DMRT6)* and *DMRTC2 (DMRT7)* were expressed exclusively in the ovaries. In the human fetal ovary, the very first meiotic cells are observed at about 11 wpf and many cells continue to initiate meiosis up to and beyond

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

Table II Sequences and references of RT–qPCR primers.

Gene	5′→3′ Forward primer	5′→3′ Reverse primer
Actb	TGACCCAGATCATGTTTGAGA	TACGACCAGAGGCATACAGG
ACTB	TGACCCAGATCATGTTTGAGA	TACGGCCAGAGGCGTACAGG
CTNNB1	ATTGTCCACGCTGGATTTTC	TCGAGGACGGTCGGACT
DAZL	CTACTCCACCCTCTGGAAATGG	TGCTTCGGTCCACAGATTTCTT
Ddx4	GAAGAAATCCAGAGGTTGGC	GAAGGATCGTCTGTCTGAACA
DDX4	TCGCTTATTACACTCACCAGCATC	GCCTCTGGGCGGATTTTT
Dmrta1	AAAGCTGATGGGATTTGGAG	CTTGAGACAGGCCAGTGGTT
DMRTA1	TCTTCTTGTCCATTCTGGCA	CTTGAGACAGGCCAGTGGTT
Dmrta2	ATTTGTCGCTCTCTTTGTTGCTT	CACCAAGGAAACCCATGCTT
DMRTA2	Hs00294890_m1 *(Applied)*	
Dmrtb1	TTCTGCATCCTGGTCATTGG	TCGCTGACCTACGATACAGACAA
DMRTB1	Hs00380834_m1 *(Applied)*	
DMRTC1	ATTTGACCATCAGAGCAG	GCAGCATGTTGTTCTCCTTCC
Dmrtc2	CCTCTTTCAGGCTTGCGAGT	CGACGTTCCAGGATGAGGAC
DMRTC2	Hs00540564_m1 *(Applied)*	
DMRT1	TGCCCCAGTTCTTCACTTTT	AGGGAAACCAAGCCAGAATC
DMRT2	CCTAGAGCTGATGTCACTTTT	TGGCCAAAAGCATTTTAGAAG
DMRT3	TCCTCTGGTCAGTGTCTTTGT	CTCTGCAGGCGCAGCTC
Fst	CCAGGCAGCTCCACTTGTGT	AGTCACTCCATCATTTCCACAAAG
NANOG	Hs02387400_g1 *(Applied)*	
PPIA	TGCTGGACCCAACACAAATG	TATTCATGCCTTCTTTCACTTTGC
SPO11	CTGTTGCTGTGCCATCGAATA	CATCTGTAACTAAATTCCGAA
STRA8	CTGGACAAAAGTGAGGTTCCG	GGCAAGCACTGAACTGGAGC

15 wpf. Interestingly, *DMRTA2 (DMRT5)*, *DMRTB1 (DMRT6)* and *DMRTC2 (DMRT7)* harbored expression profiles, which correlated with the timing of meiotic initiation and were comparable to that of *STRA8*, the gatekeeper of the mitotic-meiotic switch. *DMRT2* was mostly expressed at earlier (from 7 to 11 wpf), and *DMRT3* at later stages of development (from 17 wpf). Similar results were obtained with a different set of gonads ranging from 5.5 to 32 wpf ($n = 18$) confirming the expression profile of *DMRTA2 (DMRT5)*, *DMRTB1 (DMRT6)*, *DMRTC2 (DMRT7)* (Supplementary data, Fig. S1).

Dmrta2, *Dmrtb1* and *Dmrtc2* are expressed in female murine germ cells during fetal life

Next, we speculated that if some DM domain genes play a significant role in the developing female germline, their expression may be conserved among mammals. Thus, we investigated the time course of expression of *Dmrta2 (Dmrt5)*, *Dmrtb1 (Dmrt6)* and *Dmrtc2 (Dmrt7)* in female and male gonads from early fetal development to adulthood in mice. The age-related profile of *Dmrta2 (Dmrt5)* expression from fetal life to adulthood indicated that, as in humans, the expression correlates with female meiotic initiation in the mouse (Fig. 2A). Expression is elevated in the ovary during the early stages of development, peaking at 13.5 and 14.5 dpc, and regressing thereafter. In the male gonads, the expression levels of *Dmrta2 (Dmrt5)* remained low throughout fetal life and increased moderately during post-natal life (32.2% of the female maximum), starting at 10 dpp, which corresponds to the initiation of meiosis in male mice.

Murine gonad *Dmrtb1 (Dmrt6)* and *Dmrtc2 (Dmrt7)* expression profiles during fetal and post-natal life were comparable to that of *Dmrta2 (Dmrt5)* (data not shown). As before, these genes were specifically expressed in the ovary at 13.5 dpc (Fig. 2B).

To determine whether *Dmrta2 (Dmrt5)*, *Dmrtb1 (Dmrt6)* and *Dmrtc2 (Dmrt7)* are expressed in somatic or germ cells, cell sorting was performed using 13.5 dpc Pou5f1-GFP(ΔPE) murine ovaries, displaying green fluorescent protein expression in germ cells (Fig. 2C). Cell sorting efficiency was assessed measuring specific germ and somatic cell markers (*Ddx4* and *Fst*, respectively), in the GFP-positive (Pou5f1+) and negative (Pou5f1−) fractions. *Dmrta2 (Dmrt5)*, *Dmrtb1 (Dmrt6)* and *Dmrtc2 (Dmrt7)* appeared to be specifically expressed in germ cell fractions (Pou5f1+). Altogether this indicates that the expression profiles of *Dmrta2 (Dmrt5)*, *Dmrtb1 (Dmrt6)* and *Dmrtc2 (Dmrt7)* are evolutionarily conserved and correlate to meiotic initiation. Interestingly, *Dmrta1 (Dmrt4)*, the closest family member to *Dmrta2 (Dmrt5)*, was poorly expressed in female fetal germ cells, although its expression was also demonstrated in the mouse embryonic ovary (Supplementary data, Fig. 2A and B).

Inhibition of *DMRTA2* expression using RNA interference

In order to investigate the role of DMRTA2 (DMRT5) in the human female germ line at the time of meiotic initiation, we established an original model combining ovarian xenografting and RNA interference.

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

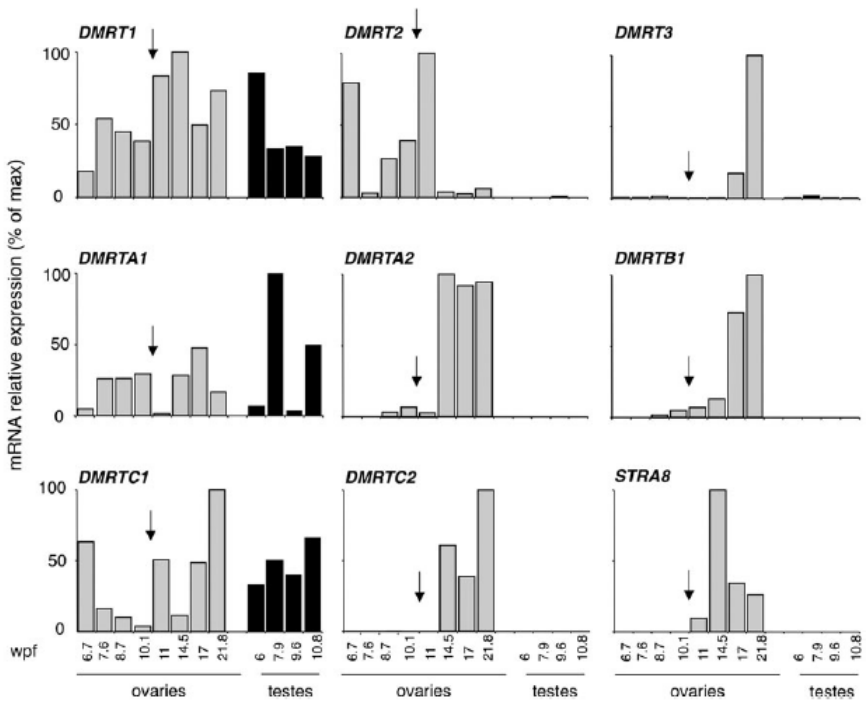


Figure 1 *DMRT* expression in human fetal gonads. DM domain gene and *STRA8* expressions were measured by quantitative RT–PCR in human fetal ovaries and testes. For ovaries, a pool of three gonads was used for mean ages 6.7, 7.6 and 11 weeks post-fertilization (wpf), a pool of two gonads for mean ages 8.7 and 10.1 wpf and one gonad for the age of 14.5, 17 and 21.8 wpf, respectively. For the testes, one gonad was used for the age of 6, 7.9 and 9.6 wpf and a pool of two gonads for mean age 10.8 wpf. Gene expressions were compared with *ACTB* expression and data are expressed as percentages of the maximum. The arrow indicates the point of entry into meiosis.

We first investigated the robustness of the xenograft model with fetal ovaries collected in first trimester (8–10 wpf) and implanted in mice for 4–8 weeks. The development of the grafted tissue was then compared both to native first trimester ovaries (Fig. 3A and B) and to older native ovaries harvested at 12–22 wpf (Supplementary data, Fig. S3B). Human ovarian grafts were successfully retrieved from 100% of grafted mice ($n = 35/35$). When we compared the size of native ovaries harvested at 8–11 wpf ($n = 4$) to the one of ovaries ($n = 3$) grafted for 4 weeks, we found a clear increase from 0.32 ± 0.05 to 1.04 ± 0.05 mm^3. Four weeks after grafting, germ cell density was similar in the graft to that observed *in vivo*, at a comparable stage of development, indicating normal germ cell survival and proliferation rates in the graft (Fig. 3A). Detailed analysis of germ cell apoptosis using active caspase-3 and TUNEL staining revealed few labeled cells while measurement of germ cell proliferation through PCNA-staining identified numerous multiplying oogonia (respectively about 5 and 90%). Furthermore, germ cell molecular differentiation, defined by the loss of stem cell antigen FUT4 expression and the appearance of the differentiation marker DDX4, occurred in the graft, as expected, when compared with ungrafted control ovaries (Fig. 3A and B). Additionally, initiation of meiosis occurred in a proper timeframe. We observed the appearance of cells with typical chromatin features, corresponding to the various stages of meiotic prophase: fine threads with bead-like structures in leptonema, filaments gathered at a nuclear pole in the zygotene stage, compacted and thick threads corresponding to paired homologous chromosomes in the pachynema stage and fine threads with a nucleolus in the diplotene stage.

Immunohistochemical studies confirmed the appearance of DDX4 in the graft (Fig. 3B). Furthermore, γH2AX, which labels DNA-double strand breaks (DNA-DSB), that are predominately observed in the leptotene and zygotene stages, and TP63, a protein considered to be the guardian of the female germline genome (Livera *et al.*, 2008), which is normally apparent in late pachytene and diplotene stage oocytes, were also detected (Fig. 3B). Ultimately in a few long-term grafted ovaries ($n = 4$, from 7 to 9 weeks) we also observed many oocytes, surrounded by somatic cells, exhibiting typical primordial and primary follicle features (Supplementary data, Fig. S3A, representative sections of two grafted ovaries, and 3B, left native ovary harvested at 17 wpf and right 8 wpf ovary grafted for 8 weeks). In conclusion, the xenografting of human fetal ovaries into immunodeficient mice served as an *in vivo* model that maintained the morphological, histological and molecular development of the germ cells over several weeks.

Interestingly, in 4 weeks-grafted ovaries, *DMRTA2 (DMRT5)* expression reached similar levels to those observed in their ungrafted counterparts, from the second trimester of pregnancy (Fig. 3C). Three different siRNAs, specifically targeting human *DMRTA2 (DMRT5)* (Supplementary data, Fig. S4B) were simultaneously injected into recipient grafted mice, to inhibit the expression of this gene. Doses of 6 μg/kg/day yielded a

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

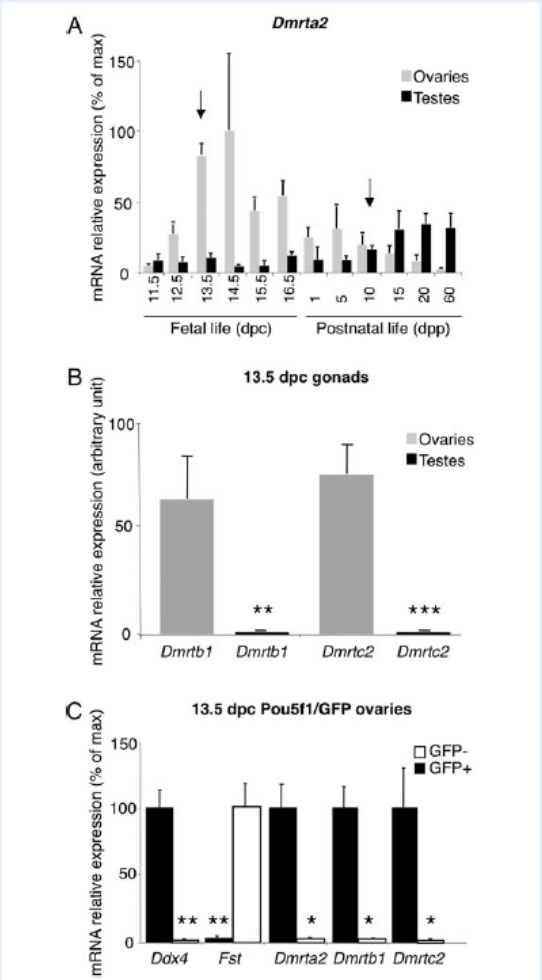


Figure 2 *Dmrta2, Dmrtb1 and Dmrtc2* are expressed in female mouse germ cells during meiotic initiation. (**A**) *Dmrta2* expression in pools of murine NMRI female and male gonads from 11.5 days post conception (dpc) to adulthood was measured by RT–qPCR. Gene expression was compared with murine *Actb* and data are expressed as percentages of the maximum ($n = 3$). The arrows indicate initiation of *Dmrta2* expression at the time of meiotic initiation in fetal ovaries and post-natal testes. (**B**) *Dmrtb1* and *Dmrtc2* expressions, in a pool of murine 13.5 dpc NMRI female and male gonads, were measured by RT–qPCR. Gene expression was normalized to the murine *Actb* and data are expressed as percentages of the maximum ($n = 3$ gonads). At this age point, the expression of these 2 DM domain genes was specific to female gonads. (**C**) *Ddx4*, *Fst* and *Dmrta2*, *Dmrtb1* and *Dmrtc2* gene expressions were measured in germ cell purified fractions (green fluorescent protein [GFP]+) (black column) and somatic cell fractions (GFP−) (white column) obtained from 13.5 dpc ovaries from Pou5f1-GFP mice, using RT–qPCR (mean ± SEM; $n = 3$; expression as percentages of the maximum normalized against *Actb*) (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$ in the paired Student's *t*-test).

strong inhibition (81%) of *DMRTA2 (DMRT5)* mRNA levels in the graft, while the mice remained healthy for the entire test period (10 days) (Fig. 3D). Given that *Dmrta2 (Dmrt5)* is expressed in the kidney (Kim *et al.*, 2003), we verified that the siRNAs did not interfere with the expression of the murine transcript in this tissue (Fig. 3E). In short, this model both faithfully mimics the physiological development of the human female germline at the critical mitotic-meiotic switch period and allows functional studies to be carried out through gene silencing strategies.

DMRTA2 inhibition impairs the growth and cellular differentiation of grafted ovaries

After 10 days of daily siRNA injections directed against *DMRTA2 (DMRT5)*, we measured various parameters, to analyze the global development of the grafts. After graft recovery from sacrificed mice, grafts that had been exposed to *DMRTA2 (DMRT5)* siRNAs were observed to be smaller than those exposed to control siRNA ($P < 0.05$) (Fig. 4A). Graft volume was decreased for all si*DMRTA2*-treated grafts (32–55% in comparison to controls). Surprisingly, neither germ cell density nor the rate of apoptosis, measured by cleaved caspase 3 staining, was affected by the inhibition of *DMRTA2 (DMRT5)* (Fig. 4A and B, HE and Cleaved caspase-3). DNA fragmentation, a hallmark of apoptosis, also failed to reveal significant change in the germ cell apoptotic rate (Fig. 4B, TUNEL). Measurement of PCNA-positive cells (Fig. 4B, PCNA), as an index of proliferation, identify no overt change neither in oogonia nor in somatic cells (respectively, 78 ± 6% versus 87 ± 20%, $P = 0.13$ and 14 ± 3% versus 19 ± 4%, $P = 0.56$ for untreated and treated germ and somatic cells, $n = 3$). Hematoxylin/eosin staining demonstrated the presence of numerous meiotic cells in controls, whereas few meiotic oocytes were detected in grafts, which had been exposed to *DMRTA2* siRNA (Fig. 4B, HE). This may, in part, explain the decrease in graft size, as the diameter (and thus the volume) of meiotic germ cells is larger than that of oogonia. Indeed the diameter of leptotene/zygotene stage oocytes is 1.7-fold greater than that of oogonia (mean 21.1 μm versus mean 12.1 μm, respectively), which yields a 4.9-fold greater volume (Fig. 4C).

DMRTA2 regulates female germ cell molecular differentiation

To further analyze the effect of *DMRTA2 (DMRT5)* inhibition on the development of human female germ cells, we analyzed various markers of undifferentiated (*NANOG*) (Kerr *et al.*, 2008), differentiating (*DAZL* and *DDX4*) (Anderson *et al.*, 2007), pre-meiotic and meiotic (*STRA8* and *SPO11*) germ cells (Le Bouffant *et al.*, 2010) (Fig. 5A). The expression of *NANOG* was unchanged while that of the markers of more differentiated germ cells was significantly decreased. The expression of *beta-catenin* (*CTNNB1*), a marker associated with female somatic cell differentiation was unaltered (Chassot *et al.*, 2008). Interestingly, the expression of both *DMRTB1 (DMRT6)* and *DMRTC2 (DMRT7)*, which correlates with meiotic entry, was equally impaired, though the siRNAs used did not target their sequences. Altogether, our data suggest that DMRTA2 (*DMRT5*) could promote germ cell differentiation shortly prior to meiotic initiation.

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

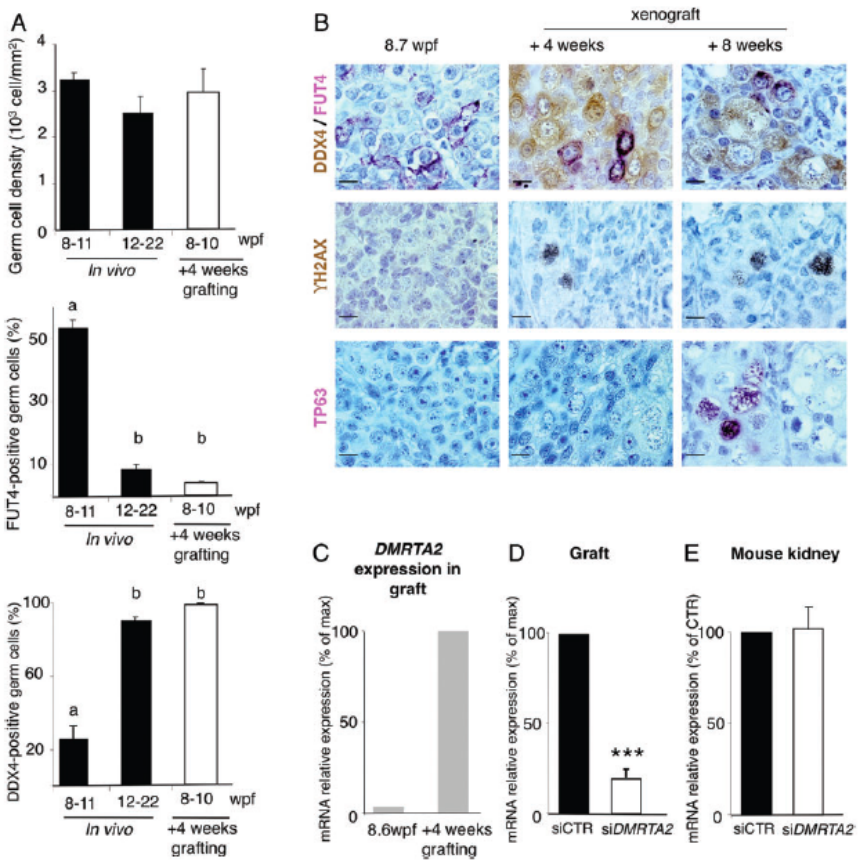


Figure 3 Xenograft model coupled with RNA interference. (**A**) Xenografting allows normal development of the human ovary. Mean ± SEM of germ cell density and proportions of germ cells positive for FUT4 and DDX4 in ovaries collected at 8–11 weeks post-fertilization (wpf) ($n = 5$) and at 12–22 wpf ($n = 4$), and ovaries collected at 8–11 wpf ($n = 8$) grafted for 4 weeks are presented. Different letters represent significantly different values derived from analysis of variance comparisons (with $P < 0.05$). (**B**) Immunohistochemical analyses show the expected appearance of γH2AX and TP63 and the disappearance of FUT4 in an 8.7 wpf ovary (left) and in 8–10 wpf ovaries grafted for 4 (middle) and 8 weeks (right). The bar represents 10 μm. (**C**) The graft does not affect *DMRTA2* expression. The graph represents *DMRTA2* expression in an 8.6 wpf ovary, before xenografting and at 4 weeks post-grafting ($n = 1$). Gene expression is reported as a percentage of the maximum and was normalized against *PPIA*. (**D**) The histogram shows the mean ± SEM of *DMRTA2* expression in grafted ovaries ($n = 5$), treated with control siRNA (black column) or with a mixture of three siRNAs, specifically targeting human *DMRTA2* (white column), $^{***}P < 0.001$ in the paired Student's *t*-test. SiRNAs were previously tested *in vitro* on human embryonic cell lines (Supplementary data, Fig. S3A). (**E**) Murine *Dmrta2* expression is not affected by si*DMRTA2* targeting the human sequence. Mean ± SEM of *Dmrta2* expression in the kidney of mice ($n = 5$) treated with control siRNA (black column) or si*DMRTA2* (white column) are represented as percentages of the control, normalized against murine *Actb*.

This hypothesis was tested by labeling the least differentiated germ cells that express FUT4, and meiotic cells, using γH2AX, a hallmark of meiotic DNA-DSB. *DMRTA2 (DMRT5)* inhibition triggered an increase of ~2-fold of FUT4-positive germ cells. Simultaneously we observed a 43% decrease in the percentage of gH2AX-positive germ cells ($n = 5$, Fig. 5B). This confirmed a likely arrest around meiotic entry.

Discussion

Our study, for the first time, identifies the presence, and reveals the importance of DMRTA2 (DMRT5) in normal human female embryonic germ cell development. DMRTA2 (DMRT5) appears to be essential in allowing the appropriate differentiation of oogonia, shortly prior to their entry into meiosis.

It is striking to note that *DMRTA2 (DMRT5)*, *DMRTB1 (DMRT6)*, *DMRTC2 (DMRT7)* (this study, Kim *et al.*, 2003) and *DMRT1* (Kim *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2012), all apparently have conserved expressions in pre-meiotic female germ cells, in mouse and human developing ovaries. We reported for the first time, the expression of *DMRTA2 (DMRT5)*, *DMRTB1 (DMRT6)* and *DMRTC2 (DMRT7)* in the human fetal ovary. Additionally, we detected the expression of *DMRT1* throughout human ovary development. These data are in line with a recent study,

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

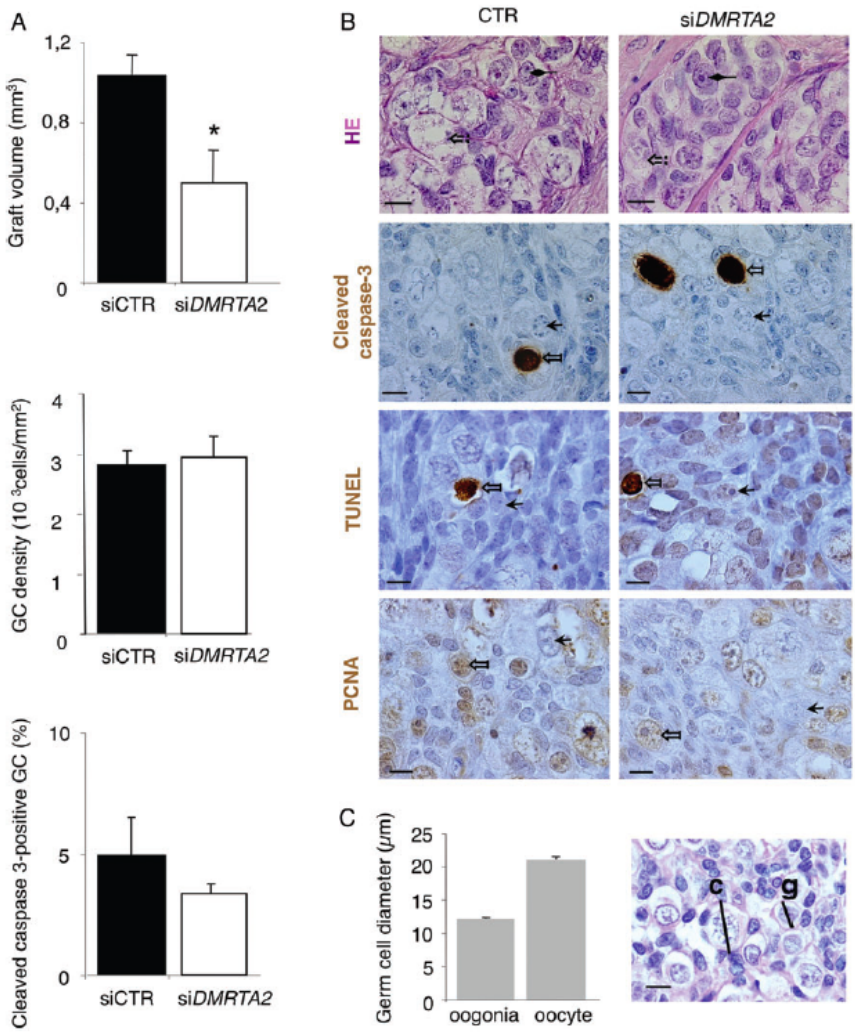


Figure 4 DMRTA2 inhibition impairs the growth and cellular differentiation of grafted ovaries. (**A**) The histograms show the mean ± SEM of graft size, germ cell density and cleaved caspase 3-positive cells (values given as a percentage) in siCTR (black column) and si*DMRTA2* (white column) treated grafts (*$P < 0.05$ in the paired Student's *t*-test). (**B**) Germ cell density was analyzed on hematoxylin-eosin stained sections; black arrows indicate mitotic oogonia and open arrows show meiotic germ cells. Immunostainings for cleaved caspase 3, TUNEL and PCNA reveal negative (black arrows) and positive (open arrows) germ cells for these markers. The bar represents 10 µm. (**C**) The germ cell diameters of mitotic oogonia and meiotic oocytes were measured on sections stained by hematoxylin-eosin. The mean ± SEM of these diameters is represented by two bars. The picture demonstrates the larger diameter of oocytes (c) in comparison to oogonia (g).

reporting DMRT1 protein expression in fetal human germ cells (Jorgensen *et al.*, 2012). In mouse embryonic gonads, the expression of *Dmrt1*, *Dmrta2 (Dmrt5)* and *Dmrtc2 (Dmrt7)* has previously been reported (Kim *et al.*, 2003). Interestingly, the expression of *Dmrtb1* (*Dmrt6*) was not demonstrated in the embryonic ovary. Moreover our study demonstrated the specific expression of *Dmrta2 (Dmrt5)*, *Dmrtb1 (Dmrt6)* and *Dmrtc2 (Dmrt7)* in murine female germ cells. Other studies previously reported the presence of Dmrt1 in murine fetal germ cells (Krentz *et al.*, 2013). Of note, Dmrta1 (Dmrt4), the closest paralog of Dmrta2 (Dmrt5), has previously been detected in mouse embryonic ovaries (Kim *et al.*, 2003) and we observed no obvious expression in germ cells. Although mRNA expression does not warrant the presence of an active protein and some DMRT family members might not always be translated (Kawamata *et al.*, 2007), it is likely that at least DMRT1 (Jorgensen *et al.*, 2012) and DMRTA2 (DMRT5, this study) proteins are present in the human gonads. Indeed, we observed a staining for DMRTA2 (DMRT5) protein specifically in germ cells in sections of human fetal ovaries (Supplementary data, Fig. S5). However, future

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

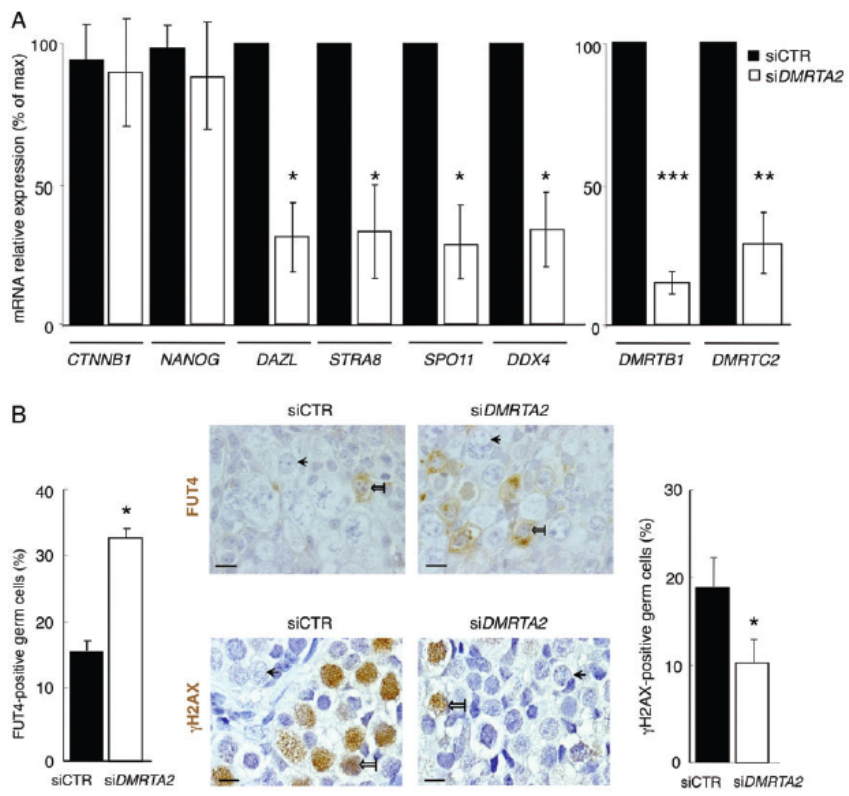


Figure 5 DMRTA2 regulates female germ cell differentiation. (**A**) The bars represent the mean + SEM of the expression of various markers in siCTR (black column) and si*DMRTA2* (white column) treated grafts, measured by RT–qPCR: *CTNNB1*, a somatic marker; *NANOG*, a stem cell marker found in oogonia; *DAZL* and *STRA8* required for meiotic entry; *SPO11*, a meiotic marker, *DDX4* normally expressed in differentiating germ cells, *DMRTB1* and *DMRTC2*. Gene expressions are expressed as a percentage of the maximum and normalized to *PPIA* (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$ and ***$P < 0.001$ in the paired Student's *t*-test). (**B**) FUT4 and γH2AX were detected by immunohistochemistry in sections from siCTR and si*DMRTA2* treated grafts (*$P < 0.05$ in the paired Student's *t*-test). Black arrows indicate the negative germ cells and open arrows denote the positive germ cells.

work will need to address the presence and activities of the other DMRT family members at the protein levels (Kawamata *et al.*, 2007).

These results suggest that these four DMRT genes may influence the progression of pre-meiotic female germ cell development, within a very narrow timeframe. This apparent co-expression of several DMRT family members is intriguing, as DMRT members target similar DNA motifs (Murphy *et al.*, 2007). A tentative explanation may be that some of these genes might regulate other *Dmrt* genes, as in the case of *Dmrt1* that was shown to bind to numerous *Dmrt* promoters (Murphy *et al.*, 2010). Furthermore it is noteworthy that sites bound by DMRT members are rather similar and that they may act as heterodimer, notably DMRT1 and DMRTA2 (DMRT5) (Murphy *et al.*, 2007). Whether a hierarchy exists between these members has yet to be elucidated. We observed that inhibition of the expression of *DMRTA2 (DMRT5)* impaired the expression of *DMRTB1 (DMRT6)* and *DMRTC2 (DMRT7)*. As such, this observation led us to propose that *DMRTA2 (DMRT5)* governs other *DMRT* expressions. However, as germ cell development is arrested, it is no surprise that expression of *DMRTB1 (DMRT6)* and *DMRTC2 (DMRT7)* is impaired. This would be true of any other genes whose expression increases during that developmental process (i.e. *DDX4*).

Altogether, we observed that the presence of cellular and molecular markers of meiotic prophase I was reduced or delayed after inhibition of *DMRTA2 (DMRT5)*. Additionally, we also documented a conserved expression of factors such as *NANOG*, associated with undifferentiated germ cells (Kerr *et al.*, 2008), and a decrease in the expression of markers, such as *DAZL* and *DDX4*, which are associated with pre-meiotic differentiation (Anderson *et al.*, 2007). These data were consistent with the observation that many germ cells retained features of undifferentiated cells, such as FUT4, and few germ cells initiated meiosis based on γH2AX staining and chromatin features. Although we described a reduction in *STRA8* expression, with no change in germ cell density, it remains doubtful that DMRTA2 (DMRT5) directly regulates *STRA8*, as this role has been proposed for the DMRT1 paralog (Krentz *et al.*, 2011). Indeed, it is perhaps more likely that DMRTA2 (DMRT5) acts on an earlier stage of meiotic commitment. It is currently accepted that meiotic commitment is a two-step process. The first step involves the acquisition of intrinsic factors enabling cells to initiate meiosis, notably

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

through the expression of *DAZL* (Lin *et al.*, 2008). The second step entails the reception of a meiosis-inducing signal that triggers *STRA8* expression, ultimately leading to meiotic entry (Le Bouffant *et al.*, 2010; Childs *et al.*, 2011). Based on our data *DMRTA2 (DMRT5)* may regulate the acquisition of the intrinsic factors, as we observed a decrease in *DAZL* expression upon DMRTA2 *(DMRT5)* inhibition. Additionally in Dmrt1$^{-/-}$ ovaries (Krentz *et al.*, 2013), an increase in the expression of markers associated with pluripotency was described. This supports the increase in undifferentiated germ cells (FUT4-positive), observed in this study. However, future studies will be required to identify the direct molecular targets of DMRTA2 (DMRT5) in female germ cells.

Nevertheless, one cannot rule out the impact of *DMRTA2 (DMRT5)* inhibition on germ cell proliferation or apoptosis. Although we observed no increase in apoptotic markers in germ cells, it is possible that transitory apoptotic processes were undetectable using these methods or that germ cell death occurred through a different pathway as this as previously been proposed in early oocytes (De Felici *et al.*, 2008). Conversely, the robust decrease in the size of grafts exposed to *DMRTA2* siRNA may result from perturbed proliferation. This last hypothesis is supported by observed decreases in germ cell numbers. Indeed if the cell volume is decreased and the density unchanged, the number of germ cells must be reduced. Such anti-proliferative or pro-apoptotic processes, which specifically target differentiating germ cells, may be alternative impact sites of the effect of *DMRTA2 (DMRT5)* inhibition. In line with our first hypothesis, this might merely be the consequence of the arrested germ cell differentiation.

Secondly, we developed an original model of xenografted first trimester fetal human ovaries, which could be used in tandem with an RNA interference strategy. This model supported the survival of ovarian cells for over 8 weeks with appropriate development of the female germline, when compared with ungrafted ovaries at equivalent developmental stages. The time course and rate of oogonia proliferation, initiation and progression of meiosis and the follicle formation were comparable to those of *in vivo* organs (i.e. ungrafted ovaries). To our knowledge, this is the first report of first trimester-ovary xenografts and the first characterization of a model that allows the initiation of human meiosis *in vivo*. Xenografting of human fetal organs, including ovaries and testes, was first described in 1974 (Povlsen *et al.*, 1974; Skakkebaek *et al.*, 1974). These, and subsequent studies (Abir *et al.*, 2000, 2003, 2009; Sadeu *et al.*, 2006; Oktem and Oktay, 2007; Lan *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010) all used second trimester ovaries (i.e. already at the follicle stage) from 20 wpf and after. Adult ovarian tissue xenografts are also used to investigate the impact of cryopreservation on follicular growth (Aubard, 2003). Altogether grafting human ovaries appears to be a reliable tool, which allows the development of the female germline, regardless of developmental stage.

Importantly we also report here for the first time, the coupled use of RNA interference and xenografting of human fetal tissues. The impact of target gene inhibition on tumor cells, using *in vivo* RNA interference, has been well documented (Landen *et al.*, 2006; Delloye-Bourgeois *et al.*, 2009; Koyanagi *et al.*, 2013). Successful gene inhibition, in grafts, using siRNA relies, in part, on the development of robust vascularization, which connects rapidly with the ovarian capillary and irrigates the entire tissue. Such vascularization is, naturally, absent in the organ model, the other documented model for studying human fetal organs (Baker and Neal, 1974; Poulain *et al.*, 2012; Tartarin *et al.*, 2012). The inhibition of gene expression, to investigate mammalian development, has usually been carried out using transgenic murine models. The model described in our study offers an invaluable opportunity to explore human organ development. Such a tool should eventually allow the investigation of those genetic diseases, which are thought to cause the impairment of normal tissue development, or examine the mechanisms of action of endocrine disruptors on the development of the human fetal ovary. Though our model has only been used for the developing human ovary in this instance, nonetheless, its value should not be underestimated, not least because, the slow development of the human ovary, when compared with that of the mouse, may be advantageous, in terms of potentially allowing a more precise identification of the developmental stages regulated by targeted genes. Furthermore, it is also noteworthy that here we inhibited the expression of the human *DMRTA2 (DMRT5)* gene, without interfering with that of its mouse homolog. This result is especially interesting as the *Dmrta2 (Dmrt5)* mutation in mouse is incompatible with life (Saulnier *et al.*, 2013). One must also consider this strategy as an efficient means to by-pass embryonic lethality of numerous mutations in mice. Ultimately, the use of RNA interference also has limitations and cannot fully obliterate the expression of a target gene.

Altogether, we believe that the described ovarian xenograft model should prove useful for future investigations of human germline, and other cell, development. The model faithfully mimics the development of germ cells from the mitotic stage to the follicular stage, thus allowing the elucidation of the mitotic/meiotic transition and meiotic progression. Secondly, the model facilitates functional studies to investigate the involvement of given genes in these processes.

In conclusion, using an original xenograft model, we highlighted the contribution of DMRTA2 *(DMRT5)* to human germ cell development. Future studies should clarify the mechanisms of action and the interplay of various DM domain genes in these cells.

Supplementary data

Supplementary data are available at http://molehr.oxfordjournals.org/.

Acknowledgements

We thank S. Messiaen for cell sorting and help for immunostaining, D. Moison and T. N'Tumba Byn for human gonads retrieval, C. Duquenne for immunostaining, V. Barroca for IP injections, E. Martini for critical reading, A. Gouret for her secretarial assistance and Angloscribe (Calvisson, France) for English language editing. We thank the Department of obstetrics and gynecology of the Antoine Béclère Hospital, Clamart, France, and patients for human material. We also thank the team within the animal housing facility at the iRCM, particularly C. Joubert for the xenograft surgical procedure and EJ. Bellefroid for help analyzing murine Dmrta2 gene.

Authors' roles

M.P., N.F. and G.L. contributed to design, acquisition of data and analysis of the data in the paper. They drafted and revised the article and gave final approval of the version to be published. S.T., B.S. and V.M. contributed to acquisition and interpretation of data, revised the paper critically for important intellectual content and gave final approval of the version to be published. A.B., R.H. and V.R.-F. contributed to the design of the

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

study, revised the paper critically for important intellectual content and gave final approval of the version to be published.

Funding

B.S. and V.M. were supported respectively by a fellowship from the Région Ile-de-France-DIM Stem Pôle and a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

Abir R, Orvieto R, Raanani H, Fisch B, Schoenfeld A, Ginton D, Nitke S, Ben Rafael Z. Development of human fetal follicles in an immunodeficient mouse. *J Assist Reprod Genet* 2000;**17**:393–396.

Abir R, Orvieto R, Raanani H, Feldberg D, Nitke S, Fisch B. Parameters affecting successful transplantation of frozen-thawed human fetal ovaries into immunodeficient mice. *Fertil Steril* 2003;**80**:421–428.

Abir R, Biron-Shental T, Orvieto R, Garor R, Krissi H, Fisch B. Transplantation of frozen-thawed late-gestational-age human fetal ovaries into immunodeficient mice. *Fertil Steril* 2009;**92**:770–777.

Anderson RA, Fulton N, Cowan G, Coutts S, Saunders PT. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev Biol* 2007;**7**:136.

Aubard Y. Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; **108**:14–18.

Baker TG, Neal P. Oogenesis in human fetal ovaries maintained in organ culture. *J Anat* 1974;**117**:591–604.

Balciuniene J, Bardwell VJ, Zarkower D. Mice mutant in the DM domain gene Dmrt4 are viable and fertile but have polyovular follicles. *Mol Cell Biol* 2006; **26**:8984–8991.

Bennett CP, Docherty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins JR, Grant D. Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet* 1993;**30**:518–520.

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

Childs AJ, Cowan G, Kinnell HL, Anderson RA, Saunders PT. Retinoic acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. *PLoS One* 2011;**6**:e20249.

De Felici M, Lobascio AM, Klinger FG. Cell death in fetal oocytes: many players for multiple pathways. *Autophagy* 2008;**4**:240–242.

Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, Guenebeaud C, Pedeux R, Firlej V, Cabon F, Brambilla C, Mehlen P, Bernet A. Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;**101**:237–247.

Evtouchenko L, Studer L, Spenger C, Dreher E, Seiler RW. A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. *Cell Transplant* 1996;**5**:453–464.

Francavilla S, Cordeschi G, Properzi G, Concordia N, Cappa F, Pozzi V. Ultrastructure of fetal human gonad before sexual differentiation and during early testicular and ovarian development. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1990;**22**:389–400.

Guerquin MJ, Duquenne C, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Lambrot R, Bakalska M, Frydman R, Habert R, Livera G. Sex-specific differences in fetal germ cell apoptosis induced by ionizing radiation. *Hum Reprod* 2009;**24**:670–678.

Guerquin MJ, Duquenne C, Lahaye JB, Tourpin S, Habert R, Livera G. New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Dev Biol* 2010;**346**:320–330.

Guo Y, Li Q, Gao S, Zhou X, He Y, Shang X, Cheng H, Zhou R. Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of Dmrt5 of zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**324**:569–575.

Hernandez-Fonseca H, Bosch P, Sirisathien S, Wininger JD, Massey JB, Brackett BG. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice. *Fertil Steril* 2004;**81** (Suppl 1):888–892.

Jorgensen A, Nielsen JE, Jensen MB, Graem N, Rajpert-De Meyts E. Analysis of meiosis regulators in human gonads: a sexually dimorphic spatio-temporal expression pattern suggests involvement of DMRT1 in meiotic entry. *Mol Hum Reprod* 2012;**18**:523–534.

Kawamata M, Inoue H, Nishimori K. Male-specific function of Dmrt7 by sexually dimorphic translation in mouse testis. *Sex Dev* 2007;**1**:297–304.

Kerr CL, Hill CM, Blumenthal PD, Gearhart JD. Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary. *Hum Reprod* 2008; **23**:589–599.

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

Kim S, Bardwell VJ, Zarkower D. Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation. *Dev Biol* 2007a;**307**:314–327.

Kim S, Namekawa SH, Niswander LM, Ward JO, Lee JT, Bardwell VJ, Zarkower D. A mammal-specific Doublesex homolog associates with male sex chromatin and is required for male meiosis. *PLoS Genet* 2007b; **3**:e62.

Konno D, Iwashita M, Satoh Y, Momiyama A, Abe T, Kiyonari H, Matsuzaki F. The mammalian DM domain transcription factor Dmrta2 is required for early embryonic development of the cerebral cortex. *PLoS One* 2012; **7**:e46577.

Koyanagi T, Suzuki Y, Saga Y, Machida S, Takei Y, Fujiwara H, Suzuki M, Sato Y. *In vivo* delivery of siRNA targeting vasohibin-2 decreases tumor angiogenesis and suppresses tumor growth in ovarian cancer. *Cancer Sci* 2013;**104**:1705–1710.

Krentz AD, Murphy MW, Kim S, Cook MS, Capel B, Zhu R, Matin A, Sarver AL, Parker KL, Griswold MD *et al.*. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**:22323–22328.

Krentz AD, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary. *Dev Biol* 2011;**356**:63–70.

Krentz AD, Murphy MW, Zhang T, Sarver AL, Jain S, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. Interaction between DMRT1 function and genetic background modulates signaling and pluripotency to control tumor susceptibility in the fetal germ line. *Dev Biol* 2013;**377**:67–78.

Lan C, Xiao W, Xiao-Hui D, Chun-Yan H, Hong-Ling Y. Tissue culture before transplantation of frozen-thawed human fetal ovarian tissue into immunodeficient mice. *Fertil Steril* 2010;**93**:913–919.

Landen CN, Merritt WM, Mangala LS, Sanguino AM, Bucana C, Lu C, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Schmandt R *et al.*. Intraperitoneal delivery of liposomal siRNA for therapy of advanced ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2006; **5**:1708–1713.

Le Bouffant R, Guerquin MJ, Duquenne C, Frydman N, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Frydman R, Habert R, Livera G. Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Hum Reprod* 2010; **25**:2579–2590.

Lin Y, Gill ME, Koubova J, Page DC. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* 2008; **322**:1685–1687.

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

Livera G, Petre-Lazar B, Guerquin MJ, Trautmann E, Coffigny H, Habert R. p63 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis. *Reproduction* 2008;**135**:3–12.

Lopes AM, Aston KI, Thompson E, Carvalho F, Goncalves J, Huang N, Matthiesen R, Noordam MJ, Quintela I, Ramu A *et al.*. Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene DMRT1. *PLoS Genet* 2013;**9**:e1003349.

Mamsen LS, Lutterodt MC, Andersen EW, Byskov AG, Andersen CY. Germ cell numbers in human embryonic and fetal gonads during the first two trimesters of pregnancy: analysis of six published studies. *Hum Reprod* 2011;**26**:2140–2145.

Matson CK, Zarkower D. Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat Rev Genet* 2012; **13**:163–174.

Matson CK, Murphy MW, Griswold MD, Yoshida S, Bardwell VJ, Zarkower D. The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *Dev Cell* 2010;**19**:612–624.

Mitchell RT, Saunders PT, Childs AJ, Cassidy-Kojima C, Anderson RA, Wallace WH, Kelnar CJ, Sharpe RM. Xenografting of human fetal testis tissue: a new approach to study fetal testis development and germ cell differentiation. *Hum Reprod* 2010;**25**:2405–2414.

Motta PM, Nottola SA, Makabe S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;**75**:5–10.

Murphy MW, Zarkower D, Bardwell VJ. Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA. *BMC Mol Biol* 2007;**8**:58.

Murphy MW, Sarver AL, Rice D, Hatzi K, Ye K, Melnick A, Heckert LL, Zarkower D, Bardwell VJ. Genome-wide analysis of DNA binding and transcriptional regulation by the mammalian Doublesex homolog DMRT1 in the juvenile testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**:13360–13365.

Oktem O, Oktay K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Res* 2007;**67**:10159–10162.

Petre-Lazar B, Livera G, Moreno SG, Trautmann E, Duquenne C, Hanoux V, Habert R, Coffigny H. The role of p63 in germ cell apoptosis in the developing testis. *J Cell Physiol* 2007;**210**:87–98.

Poulain M, Frydman N, Duquenne C, N'Tumba-Byn T, Benachi A, Habert R, Rouiller-Fabre V, Livera G. Dexamethasone induces germ cell apoptosis in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:E1890–E1897.

Povlsen CO, Skakkebaek NE, Rygaard J, Jensen G. Heterotransplantation of human foetal organs to the mouse mutant nude. *Nature* 1974;**248**:247–249.

Quinonez SC, Park JM, Rabah R, Owens KM, Yashar BM, Glover TW, Keegan CE. 9p partial monosomy and disorders of sex development: review and postulation of a pathogenetic mechanism. *Am J Med Genet A* 2013;**161A**:1882–1896.

Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 2000;**14**:2587–2595.

Sadeu JC, Cortvrindt R, Ron-El R, Kasterstein E, Smitz J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril* 2006;**85**(Suppl 1):1130–1141.

Saulnier A, Keruzore M, De Clercq S, Bar I, Moers V, Magnani D, Walcher T, Filippis C, Kricha S, Parlier D *et al.*. The doublesex homolog Dmrt5 is required for the development of the caudomedial cerebral cortex in mammals. *Cereb Cortex* 2013;**23**:2552–2567.

Skakkebaek NE, Jensen G, Povlsen CO, Rygaard J. Heterotransplantation of human foetal testicular and ovarian tissue to the mouse mutant nude. A preliminary study. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1974;**29**:73–75.

Soleimani R, Van der Elst J, Heytens E, Van den Broecke R, Gerris J, Dhont M, Cuvelier C, De Sutter P. Back muscle as a promising site for ovarian tissue transplantation, an animal model. *Hum Reprod* 2008;**23**:619–626.

Souquet B, Tourpin S, Messiaen S, Moison D, Habert R, Livera G. Nodal signaling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. *Endocrinology* 2012;**153**:2466–2473.

Stoop H, Honecker F, Cools M, de Krijger R, Bokemeyer C, Looijenga LH. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Hum Reprod* 2005;**20**:1466–1476.

Tartarin P, Moison D, Guibert E, Dupont J, Habert R, Rouiller-Fabre V, Frydman N, Pozzi S, Frydman R, Lecureuil C *et al.*. Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum Reprod* 2012; **27**:3304–3314.

Wu D, Lei Y, Tong Y, Tang F, Qian Y, Zhou Y. Angiogenesis of the frozen-thawed human fetal ovarian tissue at the early stage after xenotransplantation and the positive effect of *Salviae miltiorrhizae*. *Anat Rec (Hoboken)* 2010;**293**:2154–2162.

Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, Obinata M, Abe K, Scholer HR, Matsui Y. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ* 1999;**41**:675–684.

Zarkower D. DMRT genes in vertebrate gametogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2013;**102**:327–356.

Downloaded from http://molehr.oxfordjournals.org/ at INSERM on September 17, 2014

Supplemental material

Immunohistochemistry for DMRTA2

Immunohistochemistry protocol is described in the main manuscript. Immunostaining was performed using an anti-DMRTA2 antibody (1/150, Abcam ab 27917-50, Cambridge, UK).

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA of a different collection of human fetal ovaries (5.5; 6.0; 6.2; 6.4; 7.3; 8.2; 8.3; 8.7; 9.3; 9.5; 10.8; 10.9; 11.1; 15.0; 17.0; 27.0; 31.0; 32.0 wpf; n=1 each) were extracted using the RNeasy mini-kit (Qiagen Courtaboeuf, France), and reverse transcription was carried out with the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions.

The 7900HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) and SYBR-green or Taqman labeling were used for quantitative RT–PCR (RT–qPCR). The comparative ΔΔcycle threshold method was used to determine the relative quantities of mRNA using ACTB (ß-actin) mRNA as endogenous reporters. Results are presented as a percentage of the maximum (i.e. the highest expression is defined as 100%). Each RNA sample was analyzed in duplicate. The sequences of oligonucleotides used with SYBR-green detection were designed with Primer express Software (table II).

Cell culture and *in vitro* RNA interference

The human embryonic kidney cell line HEK293 (ATCC biomaterials, distributed by LGC Standards, Molsheim, France) was transfected with siRNA (Sigma Aldrich, Evry, France), using a jetPRIME transfection reagent, according to the manufacturer's protocol (Polyplus, France). A universal negative siRNA and three different sequences of siRNA, directed against *DMRTA2* were transfected. Cell cultures were stopped 24 hours after transfection with RLT buffer and kept at -20°C for gene expression analysis (Supplemental Material, Fig. 3A).

Legends for supplemental figures

Supplemental figure 1: *DMRT* expression in native human fetal ovaries

DMRTA2, *DMRTB1*, *DMRTC2* and *STRA8* expressions were measured by quantitative RT-PCR in human fetal ovaries. Each point represents one gonad of respective age (5.5 to 32

wpf). Gene expressions were compared to *ACTB* expression and data are expressed as percentages of the maximum.

Supplemental figure 2: *Dmrta1* expression in murine ovaries

A- *Dmrta1* expression was measured by RT-qPCR in pools of murine NMRI female and male gonads at 13.5 dpc. Gene expression was compared to murine *Actb* and mRNA relative expressions are expressed in arbitrary unit (n=3).

B- *Dmrta1* gene expression was measured in germ cell purified fractions (GFP+) (black column) and somatic cell fractions (GFP-) (white column) obtained from 13.5 dpc ovaries from Pou5f1-GFP mice, using RT-qPCR (mean+/-SEM; n=3; expression as percentages of the maximum normalized against *Actb*). (*P<0.05 in the paired Student's "t" test)

Supplemental figure 3: long term xenograft

A- Representative sections of an 8.3wpf ovary grafted during 9 weeks at low (left) and medium (right) magnification. Follicles were observed in sections stained by hematoxylin-eosin in this long-term graft. The bars represent 40 and 20µm respectively left and right images.

B- Representative images of a native second trimester ovary (17 wpf, ungrafted, left) and of a first trimester (8wpf) ovary grafted for 8 weeks (+8 weeks grafting, right). Immunohistochemical analyses show the expected appearance of γH2AX and TP63 and the disappearance of FUT4 during the graft period as in late fetal ungrafted ovaries.

Supplemental figure 4: siRNA design and validation.

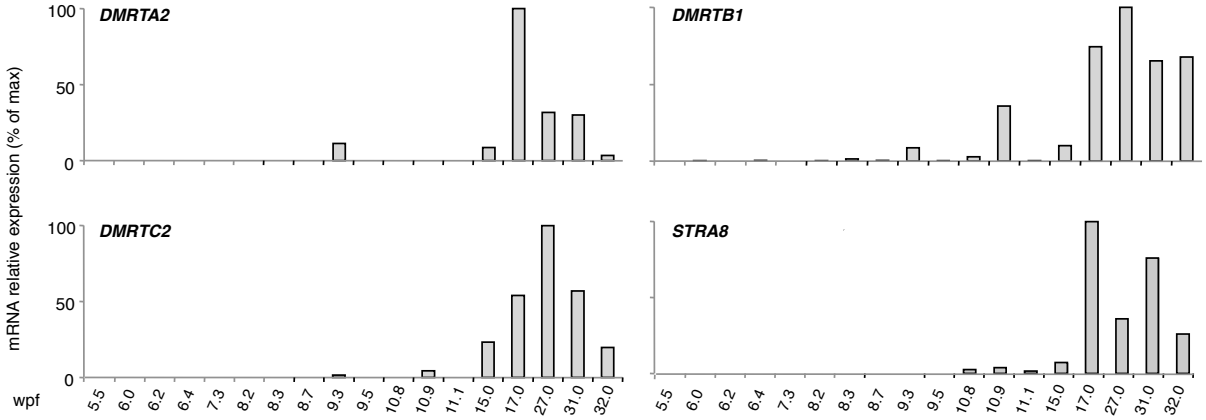
A- The histogram shows *DMRTA2* expression in the human embryonic cell line HEK293 (mean+/-SEM; n=7; expression as percentages of the maximum normalized against *PPIA* n=5), transfected with control siRNA (black column) or with one of the 3 siRNAs or a mixture of the 3, specifically targeting human *DMRTA2* (white columns). The expression of *ACTB* in the same transfected cells (mean+/-SEM; n=7; expression as percentages of the maximum normalized against *PPIA* n=5) was not affected in the cells transfected with siRNA targeting *DMRTA2* in comparison with cells transfected with the siCTR.

B- The sequences of the 3 siRNAs targeting *DMRTA2* were aligned with the human and murine sequences of *DMRTA2* with the online software Multalin (www.multalin.toulouse.inra.fr). Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res*., **16**, 10881-90.

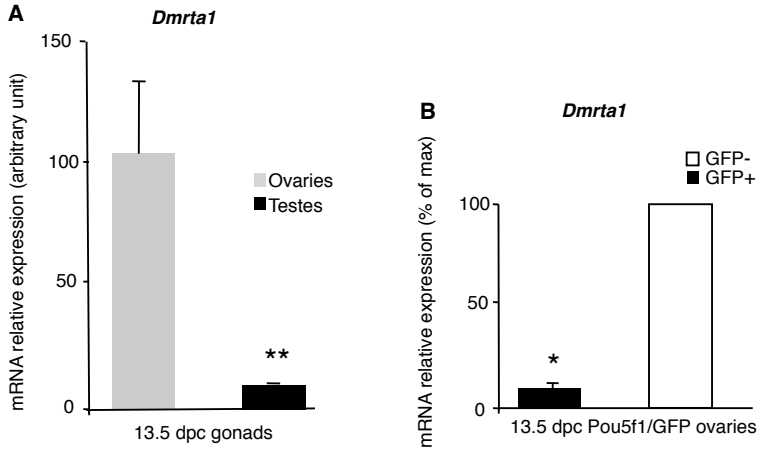
Supplemental figure 5: DMRTA2 immunostaining

Immunostaining for DMRTA2 was performed on fetal kidney sections without primary antibody (A) as a negative control and with primary antibody (B) as a positive control. Representative sections of an 8.6 wpf ovary stained for DMRTA2 are presented at low (C, bar represents 40µm) and high (D, bar represents 10µm) magnification.

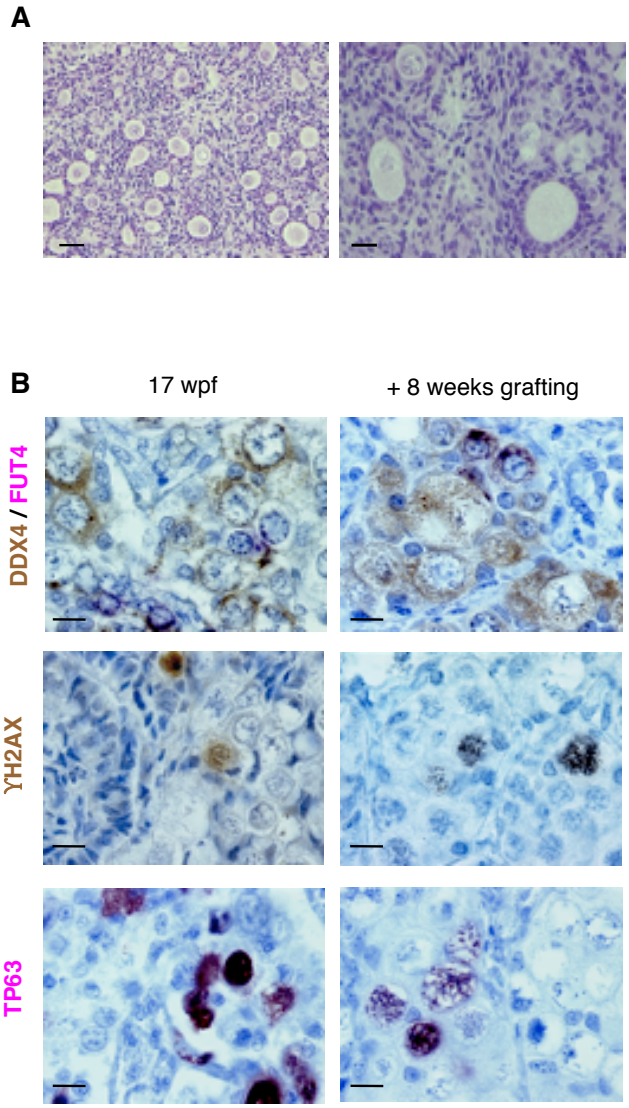
Supp Figure 1:



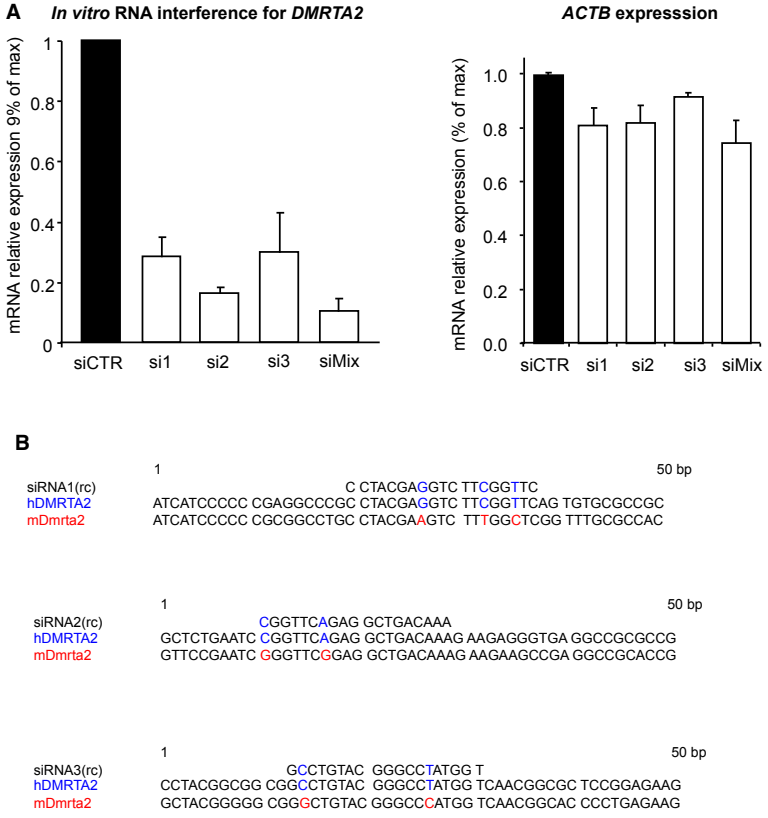
Supp Figure 2:



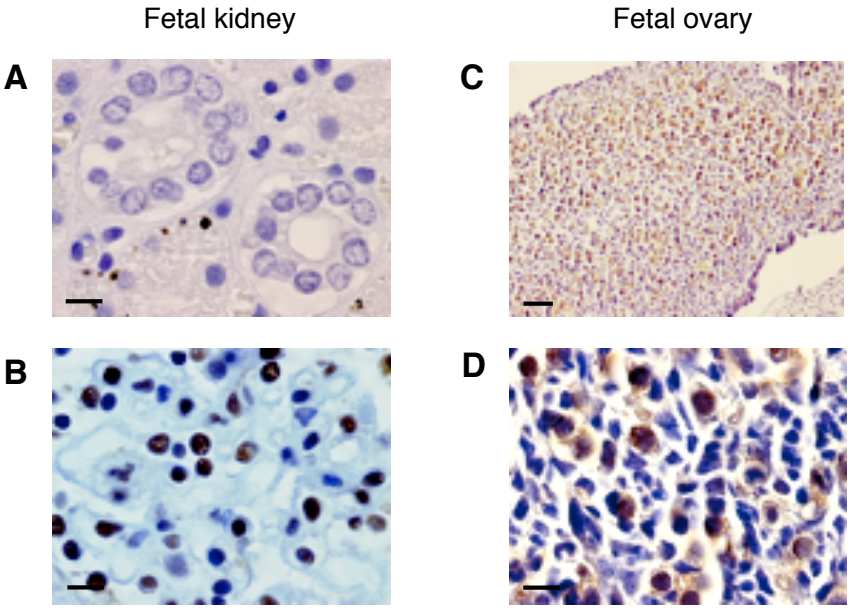
Supp Figure 3:



Supp Figure 4:



Supp Figure 5:



RESULTATS 2

Persistance de cellules préméiotiques dans l'ovaire fœtal

La présence de cellules souches dans l'ovaire post-natal humain est un sujet soumis à de vives controverses (White et al., 2012) mais qui peut conduire au développement de thérapies capables de restaurer le fonctionnement de ce tissu. De telles cellules devraient être capables d'échapper au processus de différenciation qui frappe la majorité des cellules germinales femelles au cours du développement : l'entrée en méiose. Le groupe de J Tilly a identifié l'existence de rares cellules souches dans les ovaires murins et humains et démontré que celles-ci étaient capables de former des cellules ressemblant à des ovocytes (White et al., 2012), pour revue (De Felici, 2010). Ces travaux restent sujet à contestation et alimentent un vif débat. Pourtant ce concept est concevable lorsque que l'on sait que les CG sont capables d'engager deux voies de différenciation : la spermatogenèse ou l'ovogenèse exclusivement en fonction de leur environnement somatique (c.a.d. du sexe somatique de la gonade dans laquelle elles se situent) et non en fonction de leur statut chromosomique (Adams and McLaren, 2002). Ainsi une ovogonie sortie du contexte ovarien et placée dans un testicule fœtal n'entrera pas en méiose et préservera l'expression de marqueurs de pluripotence, comme une cellule germinale mâle. Si des cellules souches ovariennes existent réellement, elles ont obligatoirement réussi à échapper au processus de différenciation femelle et à l'entrée en méiose pendant la vie fœtale. Et donc qu'un mécanisme moléculaire d'échappement, bloquant l'entrée en méiose dans une partie des ovogonies, doit exister. La caractérisation de la lignée germinale présente un intérêt fondamental dans la compréhension de la biologie ovarienne. L'approche expérimentale à travers l'étude du développement ovarien est un volet complémentaire qui peut permettre i) de mieux comprendre la biologie de telles cellules, ii) étudier les mécanismes qui autoriseraient l'existence de telles cellules et iii) approfondir nos connaissances fondamentales de la transition mitose/méiose.

Un des axes de recherche du LDG portait, avant mon arrivée au laboratoire, sur cette caractérisation des CG dans l'ovaire fœtal humain. Peu de marqueurs du développement de la lignée germinale femelle avaient été décrits chez l'Homme et l'objectif était de caractériser le développement ovarien depuis les stades précoces (6sg) jusqu'aux stades les plus tardifs (35 sg) du développement, mis à notre disposition grâce à une collaboration avec le Service de Gynécologie-Obstétrique de l'hôpital Antoine Béclère. Une banque d'ADNc humains amplifiés (gonades humaines mâles de 6 à 11 sg et femelles de 6 à 27 sg) avait été réalisée par Nelly Achour-Frydman dans le but d'effectuer de nombreuses analyses à partir d'un seul échantillon.

Les données obtenues indiquent que certaines CG sont en effet capables de préserver des marqueurs de pluripotence tels que *NANOG*, *D240* and *NANOS3,* ainsi qu'une activité mitotique (donc de ne pas rentrer en méiose) pendant plusieurs mois au cours du développement ovarien humain. Cependant, l'étude de la prolifération des CG par immunomarquage de Ki67 ou intégration de BrdU a permis de mettre en évidence que contrairement à la souris, un certain nombre de CG constituait une population de cellules dans un état similaire à une quiescence.

Ces cellules présentant des caractéristiques proches des pro-spermatogonies fœtales, nous avons investigué les marqueurs de la voie de différenciation mâle. Ces travaux ont permis de confirmer l'expression de *CYP26B1* et *NANOS2* dans les ovaires fœtaux humains alors que ceux-ci étaient spécifiquement exprimés dans le testicule chez la souris. Il a de plus été montré, par des cultures organotypiques, que les voies du CYP26B1 et du FGF9 étaient actives dans l'ovaire fœtal humain. Les mécanismes de prévention testiculaire de l'entrée en méiose existerait dans l'ovaire fœtal humain et permettraient la persistance de CG pré-méiotiques. Ces résultats renforcent le concept de J. Tilly et la persistance de cellules souches dans l'ovaire.

Long-term persistence of pre-meiotic cells in the human fetal ovary

Running Title: Is human fetal ovary a testis?

Nelly FRYDMAN, Marine POULAIN, Clotilde DUQUENNE, Sophie TOURPIN, Sébastien MESSIAEN, René HABERT, Virginie ROUILLER-FABRE, Alexandra BENACHI, Gabriel LIVERA

Introduction

The survival, proliferation, and differentiation of germ cells in the mammal fetal gonad determine, in part, future adult fertility. Much of our knowledge regarding molecular mechanisms governing germ cells differentiation and their interactions with surrounding somatic cells originates from studies in rodent and little is known about germ cell development in human. Because of their precious nature with regard to fertility, understanding the physiological requirements of human fetal germ cells is therefore crucial.

In mice, germ cell sex is determined between 11.5 and 13.5 days post-conception (dpc). During this period both XX and XY germ cells proliferate actively. At 13.5 dpc, XX germ cells in the ovary initiate meiosis whereas in the testis XY germ cells progressively stop proliferating to enter the quiescence phase at 15.5 dpc. Male meiosis will be initiated later at puberty (Western et al., 2008). The external signals that control the decision for germ cells to enter or not into meiosis include the balance between production and degradation of retinoic acid (RA) and the existence of at least one secreted meiosis-preventing factor (Bowles et al., 2006; Bowles and Koopman 2007, Anderson et al., 2008).

RA signalling acts on germ cells to promote the expression of *Stimulated by Retinoic Acid* (*Stra8*), a protein required for pre-meiotic DNA replication. In fetal testis, meiotic entry is actively prevented by elevation in the expression of the retinoid-metabolizing enzyme, Cytochrome P450, Family 26, subfamily B, polypeptide 1 (CYP26B1), which degrades RA. Embryonic testes reportedly show an important decline in *Cyp26b1* expression (of 80%) between 13.5 and 14.5 dpc. At this time the waning RA metabolic activity allows the increase in the expression of *Nanos2,* which is believed to prevent the male germ cells to initiate meiosis. NANOS2 is a RNA-binding protein acting to “lock in” the male germ cell differentiation program maintaining germ cells in G0/G1 phase and repressing *Stra8* expression in the fetal testis. Ectopic expression of this gene in XX germ cells prevents them to enter into meiosis. Moreover, transgenic analysis has showed that NANOS2 is sufficient to repress *Stra8* expression, prevent meiosis, and induce XX germ cells to adopt a male fate

(Suzuki and Saga, 2008). In addition to CYP26B1, Fibroblast growth factor 9 (FGF9) has been suggested to be a male-specific factor inhibiting meiosis. FGF9 plays a pivotal role in sexual differentiation of somatic cells of the gonads following the up-regulation of *Sry* and *Sox9* in fetal testes, with complete male to-female sex reversal observed in *Fgf9*-null mice. Moreover, *in vivo* and *in vitro* studies suggest that FGF9 also acts directly on germ cells to make them less vulnerable to the RA induced up-regulation of *Stra8* (Bowles et al., 2010) and acts as an inhibitor of meiosis through the up regulation of *Nanos2* (Barrios et al., 2010).

In the human fetal gonad, somatic sexual differentiation occurs around 6 weeks post fertilization (wpf) (Pelliniemi et al., 1993; George and Wilson, 1994), germ cells undergo several rounds of mitotic replication and contrarily to rodents, cell cycle arrest in human testis is debated (Bendsen et al., 2003; O'Shaughnessy et al., 2007). In the human fetal ovary, germ cells initially display a similar mitotic activity (Bendsen et al., 2006) and meiotic cells appear between 10 and 11 wpf (Gondos et al., 1986; Le Bouffant et al., 2010). But in contrast to the rodent, in which the onset of meiosis and germ cell differentiation occurs in a synchronized wave along the axis of the gonad (Menke et al., 2003; Bullejos and Koopman, 2004), in the human fetal ovary several subpopulations overlap in space and time such that undifferentiated germ cells are still detectable in the ovary until birth (Stoop et al., 2005; Anderson et al., 2007; Kerr et al., 2008).

In a previous study, we demonstrated the similar requirement of RA for meiosis initiation between humans and rodents but some aspects of the process seem to be different in the human embryonic ovary. RA induces meiosis as defined by cytological criteria and molecular markers but with an intriguing considerable lack of synchronicity in human fetal ovaries before 15 wpf (Le Bouffant et al., 2010) suggesting that a different local control of germ cell differentiation occurs in the human fetal ovary compared to the rodent at the equivalent developmental stage.

To clarify how a number of germ cells escape meiotic entry in the developing human ovary, we hypothesized that ovary may partially use "testicular signaling pathway" well described in rodents. We thus undertook an extensive study on 21 human fetal ovaries ranging from 6.4 and 35 wpf. We analyzed the expression and location of numerous male markers and set up an organ culture model to investigate FGF9 signaling. This is the first demonstration that specific testicular markers are expressed in human fetal ovary and involved in meiotic inhibition.

Results

Late fetal human ovaries still contain mitotic germ cells

We first analyzed the expression of various markers of the ovarian development at stages ranging from 6.7 up to 27 wpf (Figure 1). As expected from 6 to 10 wpf we observed predominantly the expression of markers associated with pluripotence common to PGC and oogonia such as *NANOG*, *D240* and *NANOS3*. Starting at 11 wpf we observed markers associated with germ cell differentiation and meiotic prophase I such as *DAZL*, *STRA8* and *SPO11* and in late developmental stages over 17wpf (i.e. containing the first dictyate oocytes enclosed in follicles) we described the apparition of *NOBOX* and the associated elevation of *OCT4* and *FOXL2*. *NOBOX* and meiotic markers were absent in human fetal testes while all markers associated with pluripotence were retrieved in early stage testes. Altogether these results were expected and validated the protocol used to analyze gene expression.

Surprisingly we also reported that the expression of markers associated with PGC and oogonia such as *NANOG*, *D240* and *NANOS3* was still observed in late developmental ovarian stages (over 20 wpf) with no major loss. This was noticeable as we expected that undifferentiated germ cells would have mostly disappeared by that time. These observations prompted us to analyze further the presence of such late undifferentiated germ cells *in situ*.

Histological analysis using 21 human fetal ovaries ranging from 6.4 to 35 wpf allowed the characterization of oogonia as small cells with high nucleo-cytoplasmic ratio and the presence of prominent nucleoli. By comparison early prophase I oocytes were easily recognized due to a considerable increase in size and the presence of thread like structures in their chromatin while oocytes reaching the diplotene stage (naked or enclosed in follicle) had an even higher increase in size with the reformation of a single nucleolus. Those observations were confirmed by the detection of associated markers such as SSEA1, D240 and AP2γ for oogonia, γH2AX for early meiotic stages and TP63, for diplotene stage oocytes (Figure 2). Both histological examination and use of markers associated to specific stage of germ cell differentiation revealed the presence of oogonia at all developmental stages including third trimester ovaries (n=10). On the contrary γH2AX was retrieved starting at 11-12 wpf and mostly after 14 wpf and TP63 production was first detected in a few cells at 16-17 wpf and abundantly present in stages over 20 wpf. Of interest in late ovaries 22-35 wpf diplotene stage oocytes enclosed into primordial and primary follicles were mostly retrieved in the medulla while oogonia were only retrieved in the cortex.

Meiotic preventing factors are expressed in human fetal ovary

As the persistence of germ cells refractory to meiotic entry is usually considered a feature of the testis due to specific mechanisms inhibiting meiotic initiation in the rodent fetal testis, we wondered whether some markers retrieved in rodent male fetal gonads might be present in the human developing ovary. Thus we investigated the expression of markers known to be associated with male developing germ cells. *NANOS2* and *DNMT3L* are specific somatic factors involved in the prevention of meiosis as well as *FGF9* and *CYP26B1*. *PLZF* is one of the spermatogonial stem cells and *ALDH1A1* has been previously reported to be expressed in the mouse and chicken-developing testis (Bowles et al., 2009) (Figure 3A). All these markers were retrieved in the human fetal ovary. Albeit *DNMT3L* levels appeared weak it was striking to note that *NANOS2* was robustly expressed, as were *FGF9* and *CYP26B1*. As the mRNA does not obligatory reflect the presence of a protein, we investigated the presence of CYP26B1, ALDH1A1 and FGF9 by immunostaining (Figure 3B). Those three proteins were retrieved in the ovarian somatic cells surrounding the germ cells. Of interest these markers were also present close to mitotic germ cells in the cortex of late fetal ovaries.

Some germ cells display a mitotic arrest in human fetal ovary

In the mouse FGF9 and CYP26B1 do not only prevent meiotic entry but also induce a germ cell mitotic arrest lasting 4-5 days. We thus wondered whether such event might also occur in the human fetal ovary. In this aim, we measured germ cell quiescence and proliferation in human fetal ovaries using respectively Ki67 immunostaining and BrdU tracing (Figure 4). Of interest not all germ cells were positive for ki67 (44.3±1.5%) indicating that some might be stopped during their cycle. Additionally organ culture in presence of daily addition of BrdU revealed that even after 96h some germ cells did not replicate their DNA. Similar experiments performed with mouse fetal ovary at equivalent stage indicate that all germ cells proliferate very actively as barely none remained BrdU-negative after 24h. These results suggest that oogonial proliferation differs between mouse and human with a possible arrest in the course of a sub population of human germ cells.

Both FGF and CYP26 pathways are active in human fetal ovary

Finally the long-term persistence of undifferentiated mitotic germ cells in the human ovary prompted us to investigate the functionality of the two major pathways known to prevent meiotic entry, namely FGF9 and CYP26B1. Using organ culture we exposed ovaries

containing only oogonia to CYP26 or FGFR inhibitors and to human recombinant FGF9 and measured the expression of *STRA8* or the presence of meiotic cells (Figure 5). In short term experiments, we first validated the efficiency of various treatments using specific target genes. *CYP26A1* and *RAR2* are target genes of RA signaling up-regulated in the human fetal ovary following RA-treatment (Le Bouffant et al., 2010). As expected, those two genes were up-regulated following CYP26 inhibitor treatment. *DUSP6* and *SPRY2* are target genes of FGF signaling and were respectively stimulated by human recombinant FGF9 treatment and down-regulated following FGFR inhibition. Having established the efficiency of the treatment? we then measured the expression of *STRA8* after 24h. Surprisingly neither CYP26 inhibitor nor FGFR inhibitor alone altered *STRA8* expression and only the simultaneous inhibition of both signaling pathways triggered a significant increase in *STRA8* expression. This indicates that both pathways are active in the human fetal ovary. In long-term culture (14 days), both CYP26 and FGFR inhibition increase significantly the percentage of meiotic cells while recombinant FGF9 treatment decreases significantly the percentage of meiotic cells. Of note no additional effect could be observed in this model.

Discussion

Our study reports that some premeiotic germ cells can remain for several months in the human fetal ovary and identifies some potential signaling pathways that may allow such persistence. Although long lasting mitotic germ cells are reported in the ovary of many invertebrates and lower vertebrates, in mammals all germ cells are commonly believed to switch from mitotis to meiosis early during fetal or post-natal life. This dogma originates mostly from work performed in rodents with meiotic entry being observed shortly after the germ cell colonization of the gonadal anlage in mice and rats. In those species, in about two days all female germ cells enter meiosis likely due to a diffusible signal. On the other hand it is rather accepted as a feature of the mammalian male gonad that the germ cells are protected from such a meiotic commitment during fetal life and go on proliferating for months with some differentiating regularly and eventually initiating meiosis. In this latter those cells are termed pro-spermatogonia and stem spermatogonia. We believe our work (here reported) narrows the difference between male and female gametogenesis by describing long lasting oogonia with similar properties in the developing human ovary. Whether the presence of these is a specific feature of the human ovary or common to many large mammals remains to be

elucidated. Of interest women are quite unique among female mammals having a fertility that is expected to last for half a century while that of a mouse hardly exceed 18 months. Another lead may reside in the building of the fetal ovary; in the human ovary several millions of oocytes will be formed while in the murine one only a few thousands can be observed. This matches with the respective size of the tissue and if one considers that oocytes are mandatory to sustain the sexual identity of the female gonad, the requirement for generating so many meiotic cells can be understood. It may thus be conceivable that similar developmental cues are rooting the need or not for maintaining a renewable germ cell population depending on the size of the developing ovary or length of the reproductive life span. Nonetheless the presence of these cells is another notable difference between murine and human gonads that should question the extrapolation of the mechanism described in the mouse.

The existence of long lasting oogonia in the human fetal ovary is sustained by several elements. First we report that markers of PGCs and pre-meiotic germ cells highly expressed before the appearance of the first meiotic cells (i.e. 10 wpf) are also retrieved much later (over 20 wpf). Among these NANOG and NANOS3 are well described in the murine germ cells and are clearly absent from meiotic cells. The late expression of these markers is coherent with the detection of SSEA1-protein that is also disappearing when cells initiate meiosis. Additionally we report that this panel of pre-meiotic markers is accompanied by the presence of marker of proliferation such as Ki67. Of interest all those indicators of the presence of non-meiotic germ cells share similar localization in the ovary, being widely distributed throughout the tissue during the first trimester and latter being restricted to the cortical area with a progressive narrowing to nest-like structures. Interestingly in those structures the presence of early stages of meiosis was also observed, suggesting that those cells have indeed the potential to form oocytes. Moreover fine histological examination reveals that in close proximity oocytes reaching the end of prophase I stage and assembling primordial follicles are present while more advance follicles were mostly observed in the medulla or subcortical area. Such data were corroborated by the detection of associated markers (i.e. γH2AX and TP63) and propose that a gradient of differentiation is established in second and third trimester ovaries. Renewing oogonia would remain in the most cortical localization and when progressing deeper would enter meiosis.

Thus one may consider two hypotheses to explain such a gradient, a meiotic inducing signal is produced in the depths? and/or meiotic preventing factors are generated in the cortex. Currently two main factors are proposed to control the timing of meiosis: retinoic acid (RA) and Fibroblast Growth Factors 9 (FGF9). Previous studies proposed that the human fetal

ovary may intrinsically form RA and we proposed ALDH1A1 to perform such a role. Here we report that ALDH1A1 is abundantly present in the ovarian cord and nest as well as in the testicular cord in the developing human gonad. Thus it may serve as a source for RA-inducing meiosis but does not explain alone why some germ cells do not enter meiosis. Of interest we report that CYP26b1 and FGF9 are also present at the protein level in the developing human ovary including at late stages. Using organ culture we demonstrated that those are likely functional pathways preventing meiosis. (Thus it may be proposed that these two meiotic inhibitors are cues to explain meiotic prevention.) However observations in murine gonads show those are usually associated with the developing testis and not with fetal ovary. A tentative explanation for such a difference may be that those are not only preventing meiosis in the developing testis but potentially also in the undifferentiated gonad and one may consider that the human ovary conserves some features of the undifferentiated gonad simultaneously with features of female differentiation (e.g. meiotic entry and follicle formation).

In the mouse developing testis FGF signaling and RA-degradation prevent meiotic entry but also induce a male fate in the germ cells through the specific up-regulation of two markers, first Nanos2 and second Dnmt3L. Such a commitment is marked by a mitotic arrest also termed quiescence phase during which germ cell genomes are submitted to epigenetic changes related to the establishment of the paternal imprinting. Of interest we retrieve a peak of Nanos2 expression in the human ovary and identify that some germ cells cease proliferating for a few days. However Dnmt3L expression is likely not significantly up-regulated, indicating no specific epigenetic modification is at oeuvre. Altogether we thus believe that Nanos2 expression and the quiescence phase can no more be considered as marker of engagement toward a male fate and merely reflect a strategy to escape meiosis. Interestingly rodent gonocytes that resume mitosis after the quiescence phase are the ones that will give rise to long-lasting stem cells in the testis. Those express some specific markers such as PLZF that we also retrieved peaking during human ovarian development. As a whole this study is challenging the concept that germ cells are committed toward a sexual fate. We believed that Nanos2 expression and the quiescence phase should no more be considered as signs of an engagement toward spermatogenesis as those may be observed in the ovary too. Having established that similar meiotic prevention pathways are functioning and inducing close response in the human fetal ovary and in the developing testis raises the question of how female human germ cells do eventually enter meiosis. A speculative but tempting explanation may be that a yet unidentified specific meiotic inducing signal independent of RA may have a

preponderant importance in the human gonad compared to the murine one.

Previous studies have already reported that the development of the human female germline is highly asynchronous. PLAP and Oct3/4-positive germ cells, likely oogonia, were also retrieved specifically in the cortex of until 36 wpf ovaries albeit in very low numbers (Stoop et al., 2005). Recently, LIN28, a marker of PGC disappearing in meiotic cells, was observed at 18 wpf in germ cells occupying a thin margin at the edge of the ovary and LIN28-staining cells was detected in more mature germ cells (SYCP3+) located toward the center of the ovary (Childs et al., 2012). Cyp26b1 and Nanos2 expression were also reported in the human fetal ovary (Le Bouffant et al., 2010; Childs et al., 2011; Jorgensen et al., 2012). All those data are in accordance with the hereby-reported results. However a question remains open; when (or if) oogonia ultimately totally disappear from the human ovary? In this study the last stage at which pre-meiotic germ cells could be identified was 35 wpf. At that stage cortical nests containing oogonia were dispersed in the cortex occupying a relatively small place in comparison to the large size of the whole ovary. Potential germ stem cells have been proposed to exist in the mammalian post-natal ovary, including in adult human ovaries. Though this data remains subject of controversies, one could easily imagine that such potential cells may be related to those that we described here shortly before birth. Indeed if those cells have been able to co-exist with small and growing follicles for several months during fetal life there is no obvious reason why they should abruptly disappear during childhood. However the drastic reshuffling of the cortex induced by each ovulation may lead to a progressive loss of cortical nests during adulthood.

As a conclusion, we report that common meiotic preventing pathways exist in the developing male and female gonads likely inducing the persistence of pre-meiotic cells with features similar to those described in male rodent embryos in the human fetal ovary. This questions the definition of the early steps of oogenesis and spermatogenesis and more precisely the identification of the event that commit towards the male or the female fate. Future studies will have to clarify the potential of the pre-meiotic germ cells observed shortly prior birth, in other words whether these are committed to differentiate at some times or whether they may go on renewing indefinitely (in the human ovary). Lastly the diverging building of the murine and the human developing female germlines suggests that there may exist specific signaling and possibly a yet unidentified additional meiotic inducing factor.

Materials and methods

Collection of human fetal gonads

Seventy-one human fetal gonads (67 ovaries and 4 testes) were included in the present study. Fetal gonads were harvested from material obtained following legally induced abortions, carried out during the first trimester of pregnancy (57 ovaries and 4 testes), or therapeutic terminations, carried out during the second or third trimesters of pregnancy (10 ovaries 14.5, 17, 22, 23, 23, 25, 27, 30, 31, 35 wpf), from the Department of Obstetrics and Gynecology at the Antoine Béclère Hospital, Clamart (France). Fetal age was calculated by measuring the length of limbs and feet according to the mathematical model developed by Evtouchenko et al., (1996) and none of the induced abortions were practiced for reasons of fetal abnormality. Fetal ovaries from the therapeutic termination of pregnancies had to display normal histological features before they were included in the study. Our study was approved by the Biomedecine Agency (number PFS12-002) and all women gave their informed consent. After collection, fetal ovaries or testes were stocked in RLT (-80°C) (Qiagen Courtaboeuf, France) for gene expression profiling, prepared for organ culture or fixed in Bouin's fluid.

Collection of fetal murine gonads

All animal studies were conducted in accordance with the French Ministry of Agriculture guidelines for the care and use of laboratory animals. Pregnant NMRI (Naval Maritime Research Institute) mice were used to harvest fetal gonads as previously described (Guerquin et al., 2010). Briefly, fetal murine gonads were harvested from fetal stage 12.5 days post conception (dpc). Males were caged with females overnight, and the presence of vaginal plug was examined the following morning. Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation and their fetuses were removed from uterine horns. Fetal ovaries were cultured in presence of BrdU (1%) for a period of 3h, 6h, 12h, 24h to measure germ cell proliferation as described in human section.

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

In order to measure the expression of multiple genes during human gonadal development, total RNA from fetal ovaries and testes were extracted using the RNeasy mini-kit (Qiagen Courtaboeuf, France), followed by a reverse transcription and whole transcriptome amplification (Quantitect whole transcriptome cDNA Amplification, Qiagen, Coutaboeuf, France). Twenty different gonads have been included for gene expression profiling (17

ovaries and 3 testes). A single ovary was used for 14.5, 17, 22 and 27 wpf and a single testis for 6 wpf. RNA from similarly aged gonads were pooled: for the ovaries a first pool was constituted with 6.5; 6.8 and 6.9 wpf leading to an estimated age of 6.7wpf, the second was 7.9; 7.6 and 7.3 wpf (estimated age of 7.6 wpf); the third was 8.8 and 8.6 wpf (estimated age of 8.7 wpf); the fourth was 10.1 and 10.0 wpf (estimated age of 10 wpf) and the fifth was a pool of three different ovaries aged of 11.0 wpf. For the testes a pool was constituted with two gonads of 10.6 and 11.0 wpf (estimated age of 11 wpf).

For the gene regulation study, 4 ovaries (8.7, 10.0, 10.4, 10.9 wpf) were used, total RNA from ovarian pieces was extracted using the RNeasy mini-kit (Qiagen Courtaboeuf, France), and reverse transcription was carried out with the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions.

The 7900HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) and SYBR-green or Taqman labeling were used for quantitative RT–PCR (RT–qPCR). The comparative DDcycle threshold method was used to determine the relative quantities of mRNA using ACTB (ß-actin*)* mRNA as endogenous reporters. Results are presented as a percentage of the maximum (i.e. the highest expression is defined as 100%). Each RNA sample was analyzed in duplicate. The sequences of oligonucleotides used with SYBR-green detection were designed with Primer express Software (Table I).

Histology and Immunohistochemistry

The fixed tissues were dehydrated, embedded in paraffin and cut into 5 µm-thick sections. For histology, sections were stained with hematoxylin and eosin. Germ cells on each section were identified on the basis of their large, spherical nuclei and clearly visible cytoplasmic membrane. Meiotic cells displayed markedly condensed chromatin forming distinct fine threads with a beaded appearance at the leptotene stage, and a nucleus showing a characteristic criss-cross of coiled chromosome threads at the zygotene stage.

Immunohistochemistry, based on peroxidase activity, was performed using commercially available primary antibodies: anti-SSEA1 (1/100, MC480 Cell Signaling, Saint Quentin en Yvelines, France), anti-D240 (1/200, ab77854 Abcam, Paris, France), anti-AP2Y (1/100, sc-12762 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-gH2AX (1/500, Euromedex, Mundolsheim, France), anti-pan-TP63 (1/100, 4A4 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-FOXL2 (1/500, generously given by Pr R. Veitia), anti-Ki67 (1/100, ASP175 Cell

signaling, Saint Quentin en Yvelines, France), anti-FGF9 (1/100, ab71395 Abcam, Paris, France), anti-ALDH1A1 (1/100, ab51028 Abcam, Paris, France), anti-CYP26B1 (1/75, HPA012567 Sigma-Aldrich, Evry, France).

Twenty-One human fetal ovaries ranging from 6.4 to 35 wpf and one fetal testis of 10 wpf were used for immunostaining. Five tissue sections per gonad were mounted onto glass slides, dewaxed and boiled for 10 min in 10 mM citrate pH 6.0. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 min. The sections were washed with phosphate buffered saline (PBS) and blocked for 30 min with 10% bovine serum albumin. Slides were incubated overnight at 4°C with the primary antibody, detected with a species-specific secondary antibody conjugated with a peroxidase activity polymer (ImmPRESS reagent kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). For all experiments, peroxidase activity was visualized using 3.3-diaminobenzidine (DAB, brown) as substrate. Five ovaries (6.4, 7.3, 8.0, 8.6, 9.8wpf) were used to determine the percentage of positive and negative germ cells for Ki67 by the counting of at least 500 cells (stained or unstained) for each ovary. Histolab analysis software was used (Microvision Instruments, Evry, France).

Organ culture

All tissues were cultured on Millicell-CM Biopore membranes (pore size 0.4 µm; Millipore, Billerica, MA, USA) in 0.3 ml of Ham's F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (1:1) containing 80 µg/ml gentamicin in a humidified atmosphere of 95% air - 5% CO2 at 37°C. The medium was changed every 48h. Human ovaries were cut into small pieces before being placed separately on Millicell membranes. The vehicle (absolute ethanol) was also included in the culture medium of the paired control. The allocation of human ovary pieces into control or experimental conditions was carried out at random for each ovary.

For meiosis cytological analysis, 7 paired ovaries were included (9.9, 3 of 10.0, 10.2, 10.5, 10.8 wpf) part of them was cultured in the absence (control) or in the presence of Talarozole (1µM - R115866, CliniSciences, Nanterre, France), specific inhibitor of Cyp26 or in presence of FGF receptor inhibitor (1µM - PD173074, CliniSciences, Nanterre, France) or with both (1µM of each) or in presence of human recombinant protein of FGF9 (1µM - TP720175, CliniSciences, Nanterre, France) during 14 days. Each data point represents the mean±SEM of at least three independent cultures. The efficiency of the treatment was assessed by

verifying the response of target genes after 24 h of culture on 4 ovaries (8.7, 10.0, 10.4, 10.9 wpf).

Measurement of germ cell proliferation

The percentage of cells in S-phase or was evaluated by immunohistochemical methods. We measured 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation, using a Cell Proliferation Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's recommendations. 17 pairs of ovaries from 7.2 to 11.8 wpf were included in this experiment. Ovaries were cultured in presence of BrdU (1%) for a period of 3h, 6h, 12h, 24h, 48h and 96h. When the duration of culture was over 24h, BrdU was added each 24h. Each data point represents the mean±SEM of at least three independent cultures. After tissue fixation three to five randomly selected sections were mounted, rehydrated and incubated for 1 h with mouse anti-BrdU antibody and with a peroxidase-linked anti-mouse immunoglobulin (IgG). Peroxidase activity was then detected by DAB. The BrdU incorporation index was determined by the counting (blinded to experimental group) of at least 500 germ cells (stained or unstained).

Statistical analysis

Each data point represents the mean±SEM of a minimum of at least three independent experiments. Data were analyzed using Student's t test. P values of less than 0.05 were considered statistically significant

References

Anderson, R.A., Fulton, N., Cowan, G., et al., (2007). Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. BMC Dev Biol. 7, 136.

Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., et al., (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 14976–14980.

Barrios, F., Filipponi, D., Pellegrini, M., et al., (2010). Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. J. Cell Sci. 123, 871–880.

Bendsen, E, Byskov, A.G., Laursen, S.B., et al. (2003). Number of germ cells and somatic cells in human fetal testes during the first weeks after sex differentiation. Hum Reprod. 18, 13–18.

Bendsen, E., Byskov, A.G., Andersen, C.Y., Westergaard, L.G. (2006). Number of germ cells and somatic cells in human fetal ovaries during the first weeks after sex differentiation. Hum Reprod. 21, 30–35.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., et al. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science. 312, 596–600.

Bowles, J., Koopman, P., (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. Development. 134, 3401–3411.

Bowles, J., Feng, C.W., Knight, D., et al., (2009). Male-specific expression of Aldh1a1 in mouse and chicken fetal testes: implications for retinoid balance in gonad development. Dev. Dynam. 238, 2073–2080.

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

Childs, A.J., Cowan, G., Kinnell, H.L., et al. (2011). Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. PLoS One. 6, e20249.

Childs, A. J., Kinnell, H. L., He, J., Anderson, R. A. (2012). LIN28 is selectively expressed by primordial and pre-meiotic germ cells in the human fetal ovary. Stem Cells and Development. 21, 2343–2349.

Evtouchenko, L., Studer, L., Spenger, C., et al. (1996). A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. Cell Transplant. 5, 453–464.

George, F., Wilson, J. (1994). Sex determination and differentiation. In: Knobil E, Neill J (eds). The Physiology of Reproduction. New York, USA: Raven Press. 3–28.

Gondos, B., Westergaard, L., Byskov, A.G. (1986). Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. Am J Obstet Gynecol. 155, 189–195.

Guerquin, M.J., Duquenne, C., Lahaye, J.B., et al. (2010). New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. Dev Bio., 346, 320–330.

Jorgensen, A., Nielsen, J.E., Jensen, M.B., et al. (2012). Analysis of meiosis regulators in human gonads: a sexually dimorphic spatio-temporal expression pattern suggests involvement of DMRT1 in meiotic entry. Mol Hum Reprod. 18, 523-34.

Kerr, C.L., Hill, C.M., Blumenthal, P.D., Gearhart, J.D. (2008). Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary. Hum Reprod. 23, 589–599.

Le Bouffant, R., Guerquin, M.J., Duquenne, C., et al. (2010). Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. Hum Reprod. 25, 2579–2590.

Menke, D.B., Koubova, J., Page, D.C., (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. Dev Biol. 262, 303–312.

O'Shaughnessy P.J., Baker P.J., Monteiro A., et al. (2007). Developmental changes in human fetal testicular cell numbers and messenger ribonucleic acid levels during the second trimester. J Clin Endocrinol Metab. 92, 4792–4801.

Pelliniemi, LJ, Fröjdman, K, Paranko, J., (1993). Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. In: Russel LD, Griswold MD (eds). The Sertoli Cell. Vienna, USA: Cache River Press, 88–113.

Stoop, H., Honecker, F., Cools, M., et al. (2005). Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. Hum Reprod. 6, 1466-1476.

Suzuki, A., Saga, Y., (2008) Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. Genes Dev. 22, 430–435.

Western, P.S., Miles, D.C., Van den Bergen, J.A., et al. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. Stem Cells. 26, 339-47.

Table I: Sequences and references of RT-qPCR primers

Gene	5'→3' Forward primer	5'→3' Reverse primer
ACTB	TGACCCAGATCATGTTTGAGA	TACGGCCAGAGGCGTACAGG
NANOG	Hs02387400_g1 *(Applied)*	
NANOS 3	AGGAGCAGGTTTCAGAGGTGC	AGAGCAGGAGGGCGAAGG
D240	TGTGGTTATGCGAAAAATGTCG	CCTTCAGCTCTTTAGGGCGAG
DAZL	CTACTCCACCCTCTGGAAATGG	TGCTTCGGTCCACAGATTTCTT
STRA8	CTGGACAAAAGTGAGGTTCCG	GGCAAGCACTGAACTGGAGC
SPO11	CTGTTGCTGTGCCATCGAATA	CATCTGTAACTAAATTCCGAA
NOBOX	AAATTAGGAAAAAGACACGAACCCT	TCGGCGTTTATCACTGTCAGG
OCT4	Hs00748296_s1 *(Applied)*	
FOXL2	AATAGCATCCGCCACAACCT	CGGCACCTTGATGAAGCACT
PLZF	GCTTCCTGATAACGAGGCTG	CCGCTGAATGAGCCAGTAA
CYP26B1	TCGAGCTTGATGGTTTCCAGA	TGCTATACATGACACTCCAGCCTT
ALDH1A1	ATCTCCTCTGCTCTGCAGGC	CACGCCATAGCAATTCACCC
NANOS 2	Hs02384758_s1 *(Applied)*	
FGF9	Hs00181829_m1 *(Applied)*	
DNMT3L	TCTGCGCCCCATGTAAGG	CGTCGTACAGGAAGAGGGCA
DUSP6	GCGTTCTACCTGGAAGGTGG	CAGGGAGAACTCGGCTTGG
SPRY2	GGTGCAAAGCCGCGATC	CCCGTTGCCACTCTGAGCT
RARβ2	AGGAAACTTTCCCTTCACTCTGC	TCCAGTCGGACTCGATGGTC
CYP26A1	GGGTTGCTCTGAAGACTTTTGAA	AGCCCTTGGGAATCTGGTATC

Figure legends

Figure 1: Genes expression profiling in human fetal gonads

Genes expression profiling was measured by quantitative RT-PCR in human fetal ovaries and testes. The histograms show the relative expression of each marker, normalized to the maximum, using beta-actin as a reporter. For ovaries, a pool of 3 gonads was used for estimated ages 6.7, 7.6 and 11 wpf, a pool of 2 gonads for estimated ages 8.7 and 10 wpf and one gonad for the age of 14.5, 17, 22 and 27 wpf respectively. For the testes, one gonad was used for the age of 6 wpf and a pool of 2 gonads for estimated age 11 wpf. **(A)** *NANOG*, Nanog homeobox; *D240* (M2A), podoplanin; *NANOS3*, Nanos homolog 3 **(B)** *DAZL*, Delated in azoospermia like; *STRA8*, stimulated by RA 8; *SPO11*, sporulation protein 11 **(C)** *NOBOX*, newborn oogenesis homeobox; *OCT4* (POU5F1), octamer-binding transcription factor 4; *FOXL2*, Forkhead box L2.

Figure 2: Immunostaining of SSEA1, D2-40, AP2g, gH2AX, FOXL2 and TP63 in human fetal ovary

(A and B) A major part of germ cells were positive for SSEA1 and D2-40 in early ovaries and then progressively lost these markers. **(C)** Of interest in late ovaries we were still able to find positive germ cells for AP2**g** in the cortex. **(D)** The first meiotic cells assessed by gH2AX staining were retrieved at 11-12 wpf and mostly after 14 wpf. **(E)** TP63, specific marker of diplotene stage was first detected in few cells at 16-17 wpf and was abundantly present in stages over 20 wpf. **(F)** FOXL2, specific marker of granulosa cells was retrieved by 22 wpf and persisted onwards. Black arrows point to germ cells positive and open arrows to negative germ cells. Scale bar, 10 µm

Figure 3: Meiotic preventing factors are expressed in human fetal ovary

(A) Using quantitative RT-PCR in human fetal ovaries and testes we revealed the expression of several male markers in human fetal ovaries. The histograms show the relative expression of each marker, normalized to the maximum, using beta-actin as a reporter. As in figure 1 estimated age of ovaries and testes are mentioned for each column. *NANOS2*, Nanos homolog 2; *DNMT3L*, DNA methyl transferase-like 3; *FGF9*, Fibroblast growth factor 9; *CYP26B1*,

cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1; *PLZF*, Promyelocytic Leukaemia Zinc-Finger; *ALDH1A1*, Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1.

(B) Immunostaining of CYP26B1, ALDH1A1 and FGF9 showed that those proteins are expressed by ovarian somatic cells surrounding the germ cells. Expression of those proteins was also retrieved in human fetal testes (picture in right). Scale bar, 10 µm

Figure 4: Some germ cells display a mitotic arrest in human fetal ovary

(A) Immunostaining of Ki67 carried out on 5 ovaries ranging from 6.4-10 wpf showed that 44.3±1.5% of germ cells were negative for this marker (open arrow) and might be in cycle arrest.

(B) Human fetal ovaries ranging from 7.2–11.8 wpf were cultured in presence of BrdU (1%) for a period of 3h, 6h, 12h, 24h, 48h and 96h. Each data point represents the Mean±SEM of at least three independent cultures in human (solid curve) and in mouse (dashed curve). Incorporation of BrdU was detected by immunohistochemistry. Black arrows indicate negative and open arrows positive germ cells. Scale bar, 10 µm

Figure 5: Both FGF and CYP26 pathways are active in human fetal ovary

(A) Target genes expression levels were assessed by RT-qPCR in fetal ovaries ranging 8.7-10.9 wpf cultured for 24h in the absence (control) or in the presence of CYP26 inhibitor and/or FGF receptor inhibitor or human recombinant FGF9. The histograms show the relative expression of each gene, normalized to the control, using beta-actin as a reporter. Each column represents the Mean±SEM of at least three independent cultures (*P<0.05, **P<0.01 in the paired Student's "t" test). *DUSP6*, dual specificity protein phosphatase subfamily 6; *SPRY2*, sprouty 2; *RARβ2*, retinoic acid receptor β2; *CYP26A1*, cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1; *STRA8*, stimulated by retinoic acid 8; *D240* (M2A), podoplanin.

(B) Human fetal ovaries ranging 9.9-10.8 wpf were cultured for 14 days in the absence or in the presence of CYP26 inhibitor and/or FGF receptor inhibitor or human recombinant FGF9. At the end of the culture, tissues were fixed and the percentage of meiotic germ cells determined. Each column represents the Mean±SEM of at least three independent cultures (*P<0.05, **P<0.01 in the paired Student's "t" test). Black arrows point out oogonia and open arrows zygotene oocytes. Scale bar, 10 µm

Figure 1

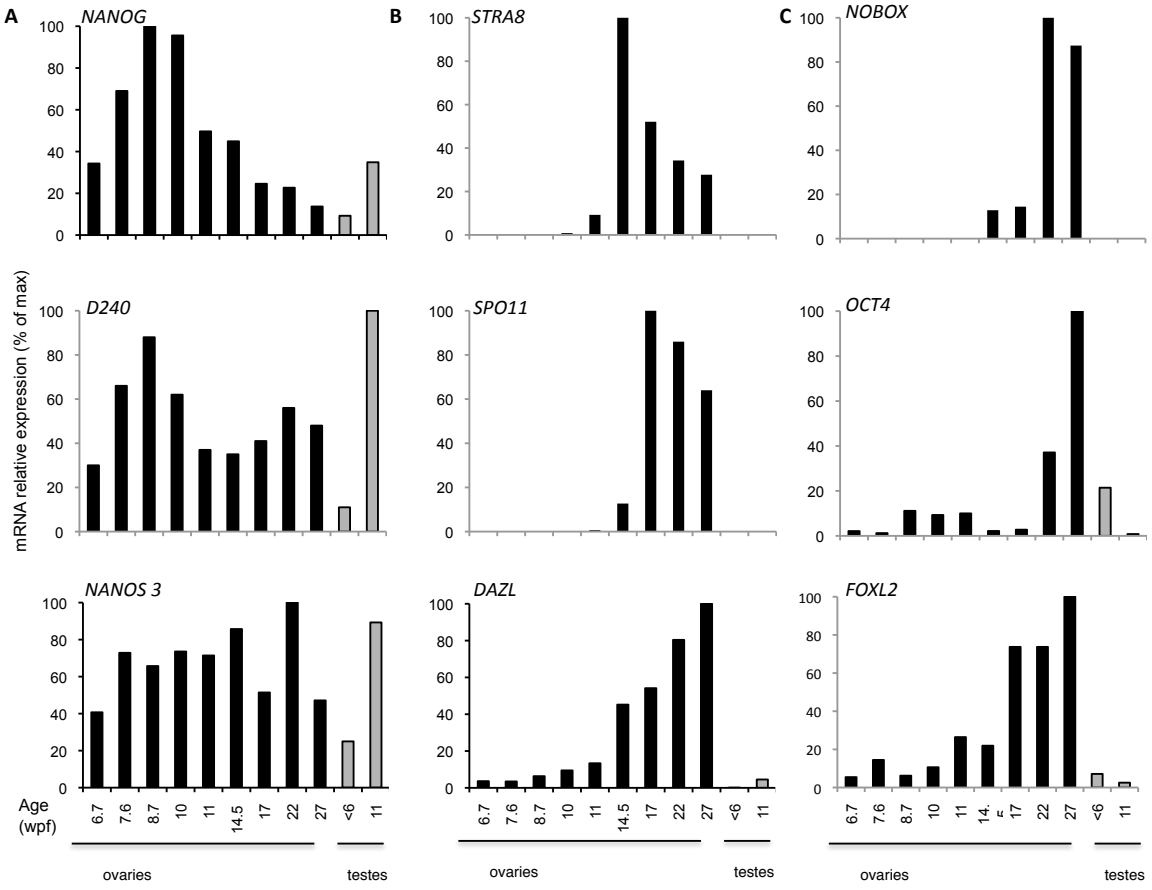

A
NANOG
B
STRA8
C
NOBOX
D240
SPO11
OCT4
NANOS 3
DAZL
FOXL2
mRNA relative expression (% of max)
Age (wpf)
6.7
7.6
8.7
10
11
14.5
17
22
27
<6
11
ovaries
testes

Figure 2:

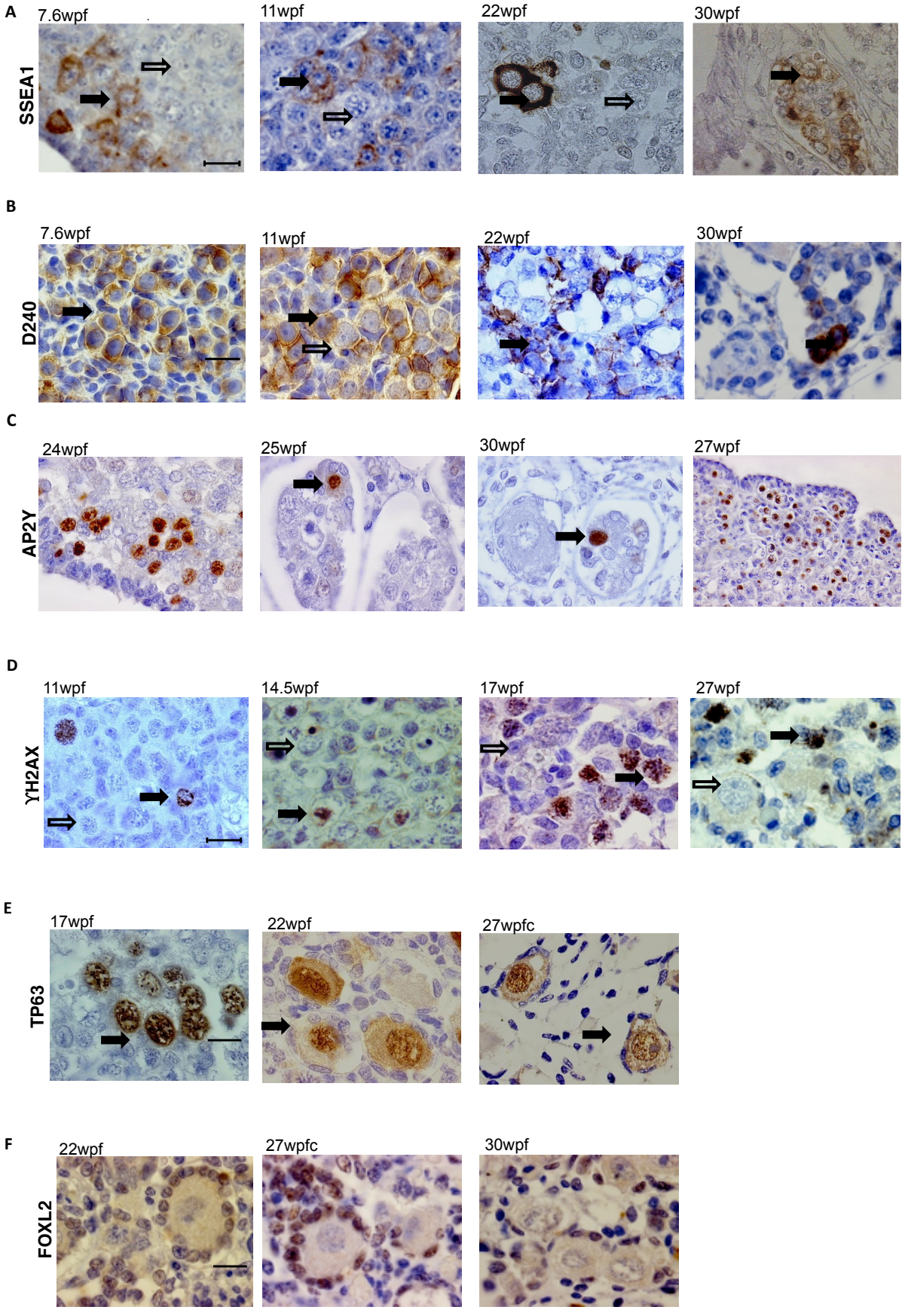

A
7.6wpf
11wpf
22wpf
30wpf
SSEA1
B
7.6wpf
11wpf
22wpf
30wpf
D240
C
24wpf
25wpf
30wpf
27wpf
AP2Y
D
11wpf
14.5wpf
17wpf
27wpf
γH2AX
E
17wpf
22wpf
27wpfc
TP63
F
22wpf
27wpfc
30wpf
FOXL2

Figure 3A:

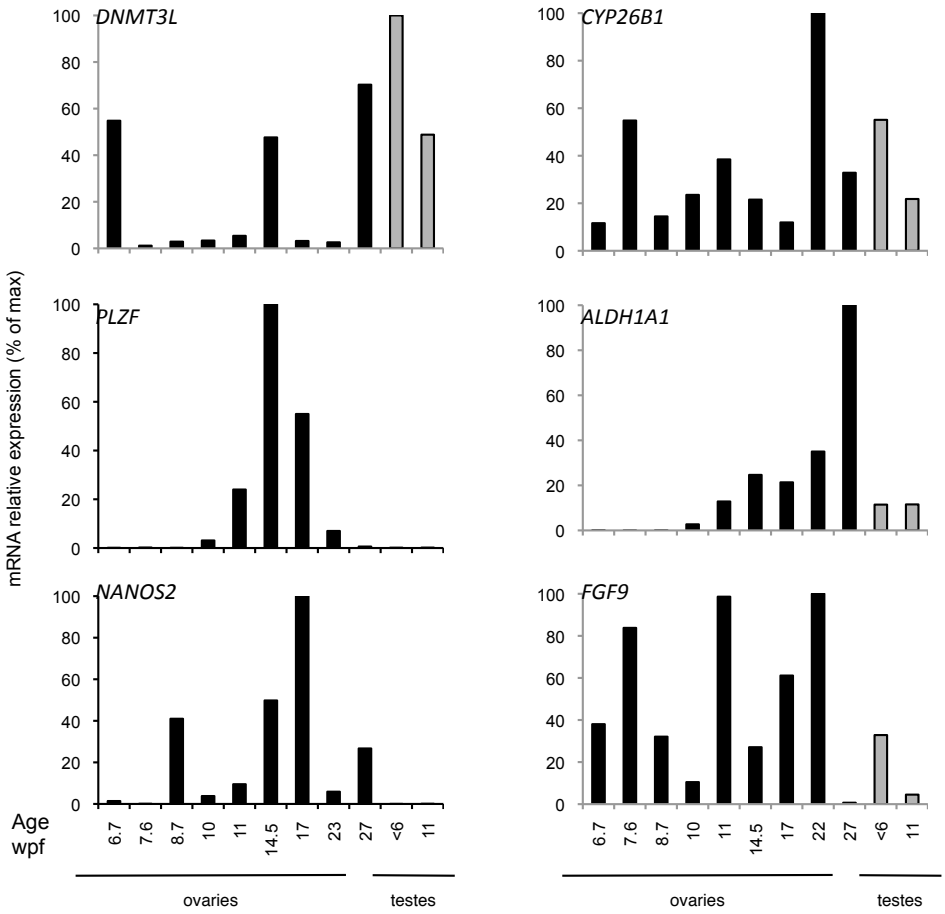


Figure 3B:

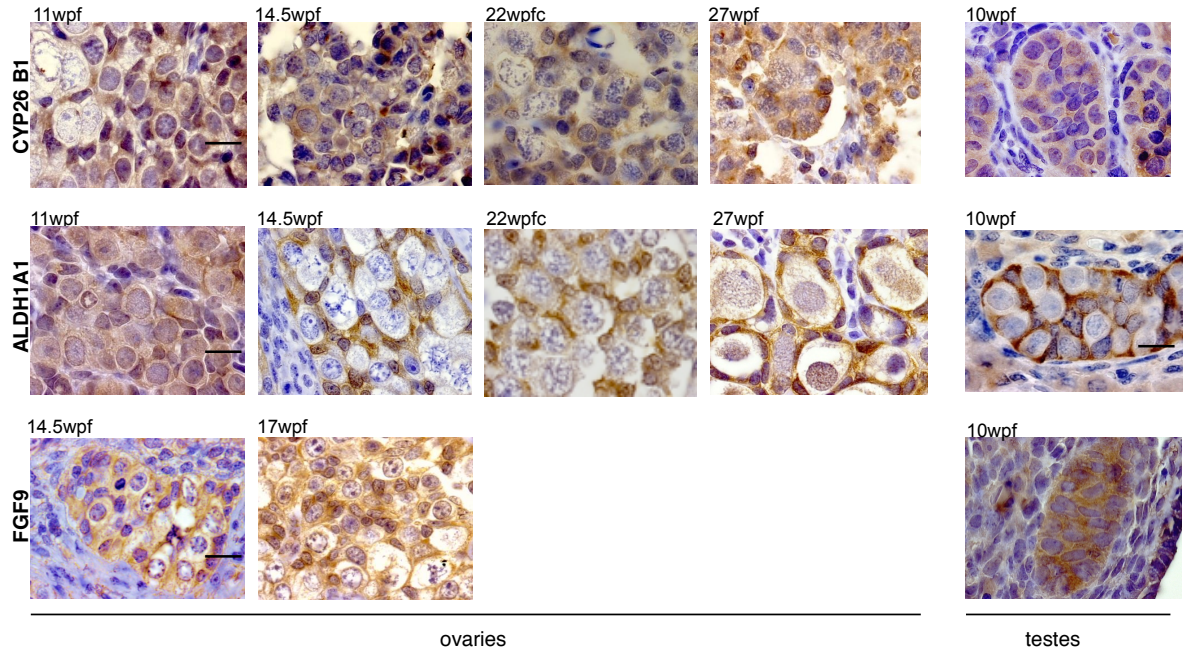


Figure 4

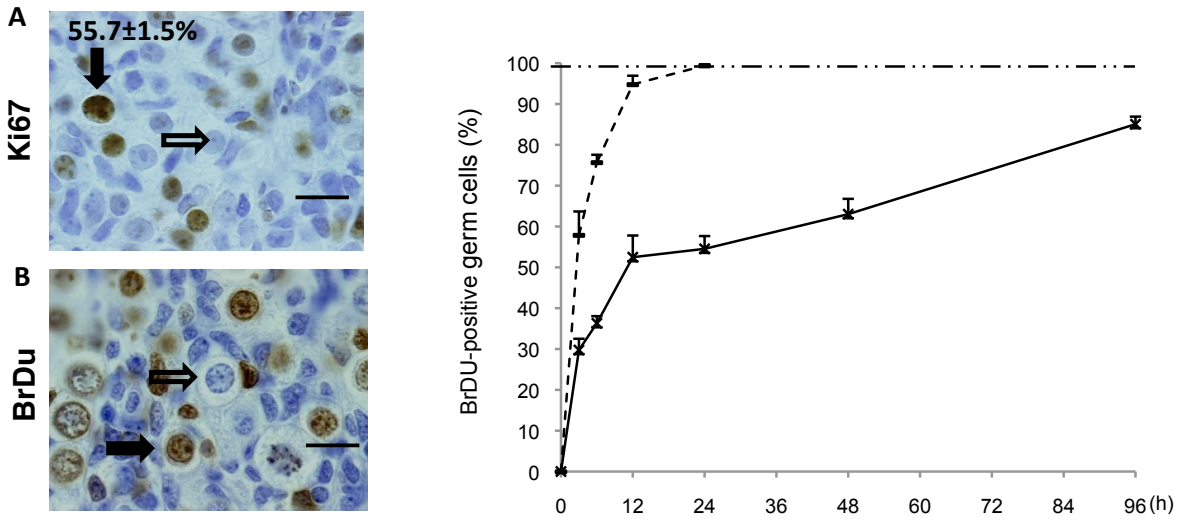


Figure 5A:

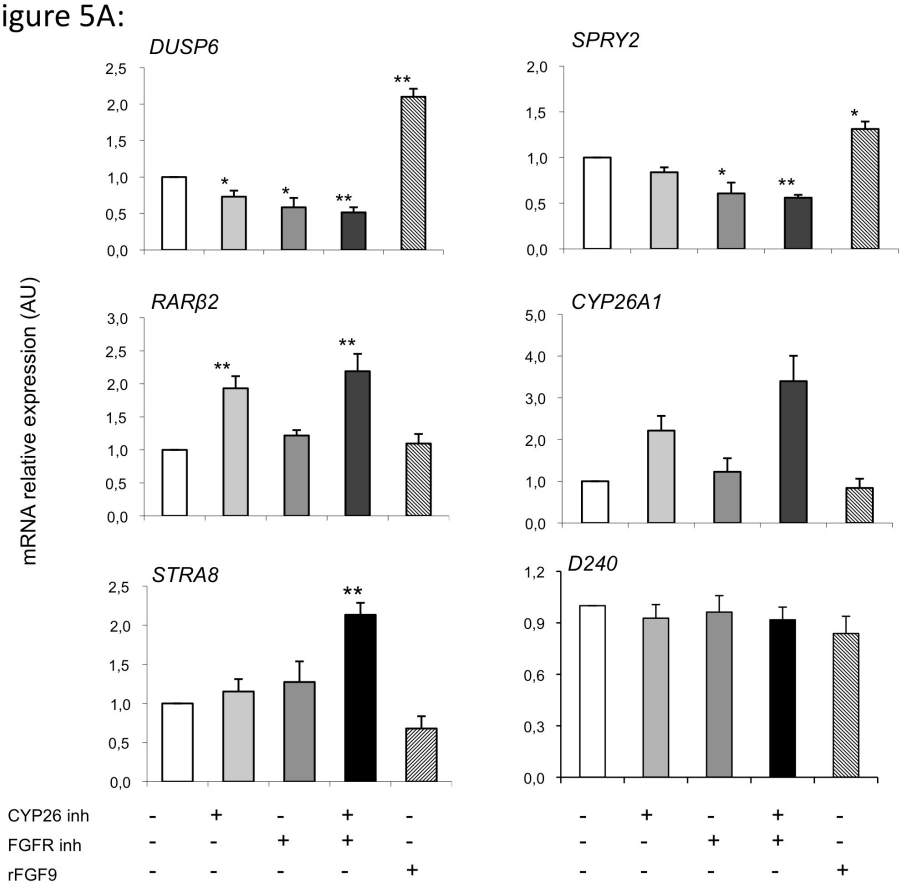
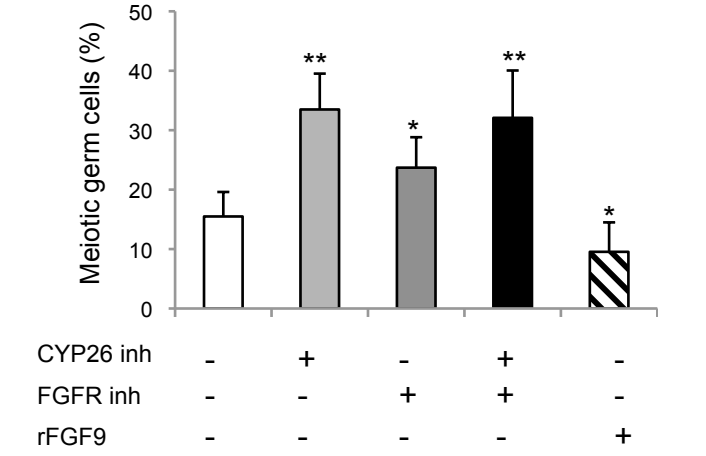
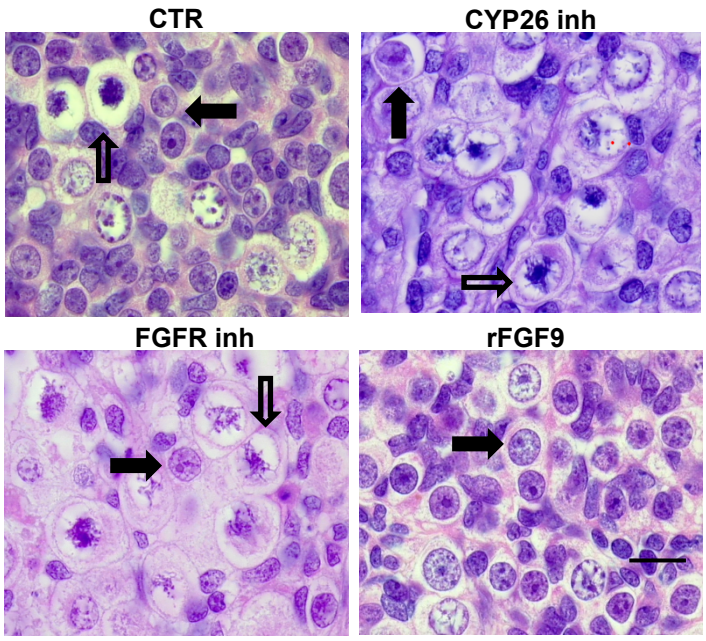


Figure 5B


Meiotic germ cells (%)
50
40
30
20
10
0
**
*
**
*
CYP26 inh - + - + -
FGFR inh - - + + -
rFGF9 - - - - +


CTR
CYP26 inh
FGFR inh
rFGF9

RESULTATS 3

Modèle de culture organotypique / Etude toxicologique

JCEM THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM

Dexamethasone induces germ cell apotosis in the human fetal ovary

Poulain M, Frydman N, Duquenne C, N'Tumba-Byn T, Benachi A, Habert R, Rouiller-Fabre V, Livera G

JCEM, 2012;97(10):E1890-7

Au cours de ma thèse, nous avons eu l'opportunité d'étudier les perturbations éventuelles des mécanismes impliqués dans la mise en place de la lignée germinale. Une étude toxicologique a été menée pour tester l'impact de l'exposition en vie fœtale à un glucocorticoïde : la dexaméthasone. Toute substance exogène peut potentiellement perturber le développement fœtal en ciblant plus ou moins la lignée germinale. Mais peu d'études ont rapporté la preuve formelle d'une perturbation des CG par une exposition en vie fœtale avec des répercussions potentielles sur la fertilité adulte (4-Octylphénol , DES, fumée de cigarette).

La dexaméthasone est administrée pendant la grossesse et en période périnatale pour plusieurs indications avec des modalités d'administration différentes. Ce glucocorticoïde passe la barrière placentaire contrairement à d'autres corticoïdes comme la prednisone ou la prednisolone. En cas de menace d'accouchement prématuré, de fortes doses de dexaméthasone sont administrées (24mg en 4 injections intra-musculaire de 6 mg toutes les 12h) pour avancer la maturation du parenchyme pulmonaire chez le fœtus et prévenir de la maladie des membranes hyalines. Le traitement peut être continué chez le nouveau-né en période post-natale (Marciniak et al., 2011). Il existe des formes non classiques de déficit en 21-OHD, beaucoup plus fréquentes et associées à une hyperandrogénie. La dexaméthasone est très faiblement inhibée par la 11β hydroxysteroïde déshydrogénase placentaire et présente une demi-vie d'élimination longue (25 fois l'activité du cortisol). C'est pourquoi elle est administrée à la dose de 20µg/kg/j avant 9 sg et jusqu'à la fin de la grossesse si le fœtus est féminin et porteur du déficit (Lo et al., 1999). Le rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS, Service des bonnes pratiques professionnelles, Avril 2011) recommande une prise en charge dès l'annonce de la grossesse que la mère soit porteuse d'une forme classique ou non et si le conjoint est également porteur (maladie AR). Un conseil génétique et un diagnostic anténatal doivent être proposés : détermination du sexe fœtal sur sang maternel dès 6 sg puis si le fœtus est féminin, mise en route du traitement par dexaméthasone. Vers 11-12 semaines d'aménorrhées, une biopsie de trophoblaste doit être proposée pour rechercher l'éventuelle mutation chez le fœtus. Si le fœtus est porteur de la maladie, le traitement est continué pendant toute la grossesse, le cas contraire il doit être arrêté. Dans la pratique, beaucoup de patientes ne bénéficient pas de cette prise en charge et reçoivent de la dexaméthasone pendant toute la grossesse à titre préventif, même si le fœtus est masculin pour prévenir des troubles hydro-sodés et du retard de croissance *in utero*.

Les fœtus sont donc exposés à une substance exogène à tous les stades de mise en place de la lignée germinale (prolifération, différenciation et entrée en méiose ou en quiescence,

reprogrammation épigénétique chez le garçon et folliculogénèse chez la fille). Connaissant les effets modulateurs des glucocorticoïdes sur des gènes impliqués dans la mort cellulaire, nous nous sommes interrogés si l'exposition à de telles substances pouvait affecter la mise en place de la lignée germinale (Robertson et al., 1995). Aucune étude toxicologique ne rapportait la recherche d'effets délétères des glucocorticoïdes sur le développement gonadique chez l'Homme mais il avait été montré que de fortes doses de dexaméthasone affecte la différenciation folliculaire et la maturation ovocytaire chez la souris (Schreiber et al., 1982) et diminuait le nombre de follicules à la naissance chez la rate (Ristic et al., 2008).

Ces travaux nous ont permis, dans un premier temps, de mettre en évidence la présence du récepteur NR3C1 aux glucocorticoïdes (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1) dans les ovaires fœtaux humains. Nous avons ensuite vérifié que la voie de signalisation de NR3C1 était active dans la gonade en regardant l'augmentation d'expression de deux gènes cibles du récepteur en réponse à la dexaméthasone : les gènes *FKBP5* et *PLZF*. Ces expériences nous ont permis de rapporter de manière étonnante, et pour la première fois, l'expression de PLZF dans l'ovaire fœtal humain. PLZF avait été décrit jusque là comme le « gardien » du potentiel souche des CG mâles et sa présence dans l'ovaire fœtal humain corrobore avec nos données précédentes retrouvant des marqueurs testiculaires dans l'ovaire. Enfin, l'exposition *in vitro* des gonades fœtales à la dexaméthasone induisait une diminution de la densité des CG et une augmentation de l'apoptose corrélée avec l'augmentation des doses de xénobiotique. Même si ces données ont été obtenues par un modèle d'étude non physiologique, elles posent la question de l'exposition *in utero* à de nombreuses substances susceptibles d'interférer avec la différenciation des CG et pouvant expliquer des infertilités à l'âge adulte. Ces résultats incitent à un suivi des femmes traitées *in utero* en vue d'une éventuelle préservation de la fertilité. En effet, si les données *in vitro* sont confirmées par des études épidémiologiques, une population de femmes à risque d'insuffisance ovarienne prématurée pourrait être identifiée. Ces patientes seraient alors éligibles pour qu'une préservation de leur fertilité leur soit proposée et il serait dans ce cas, tout à fait envisageable de proposer à ces femmes de congeler leurs ovocytes lorsqu'elles sont encore jeunes, si elles le désirent.

Dexamethasone Induces Germ Cell Apoptosis in the Human Fetal Ovary

Marine Poulain, Nelly Frydman, Clotilde Duquenne, Thierry N'Tumba-Byn, Alexandra Benachi, René Habert, Virginie Rouiller-Fabre, and Gabriel Livera

Commissariat à l'Energie Atomique (M.P., N.F., C.D., T.N'T.-B., R.H., V.R.-F., G.L.), Direction des sciences du vivant/Institut de radiobiologie cellulaire et moléculaire/Service cellules souches et radiation/ Laboratoire de Développement des Gonades (LDG), Unité Cellules Souches et Radiation; Université Paris-Diderot (C.D., T.N'T.-B., R.H., V.R.-F., G.L.), Sorbonne Paris Cité, LDG, Unité Mixte de Recherche (UMR)-967; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 967 (M.P., N.F., C.D., N.N'T.-B., R.H., V.R.-F., G.L.); and Université Paris-Sud (M.P., N.F.), LDG, UMR-967, F-92265 Fontenay aux Roses, France; and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Unité de Biologie de la Reproduction (A.B., M.P., N.F.) and Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction (A.B.), Hôpital Antoine Béclère, and Université Paris-Sud (A.B.), Clamart, F-92140, France

Context: The 21-hydroxylase deficiency is the most common cause of congenital adrenal hyperplasia. Pregnant women presenting a risk of genetic transmission may be treated with synthetic glucocorticoids such as dexamethasone (DEX) to prevent female fetus virilization.

Objective: The aim of this study was to assess the potential deleterious effects of DEX exposure on fetal ovarian development.

Settings: Human fetal ovaries, ranging from 8–11 weeks after fertilization, were harvested from material available after legally induced abortions. They were cultured in the absence or presence of DEX (2, 10, or 50 μM) over 14 d, and histological analyses were performed.

Results: The glucocorticoid receptor NR3C1 was present and the signaling pathway active in the fetal ovary as demonstrated by the expression of NR3C1 target genes, such as *PLZF* and *FKBP5*, in response to DEX exposure. DEX decreased germ cell density at the 10 and 50 μM doses. Exposure to DEX, even at the highest dose, did not change oogonial proliferation as monitored by 5-bromo-2′-deoxyuridine incorporation and significantly increased the apoptotic rate, detected with cleaved caspase 3 staining. Interestingly, the expression of the prosurvival gene *KIT* was significantly decreased in the presence of DEX during the course of the culture.

Conclusion: We have demonstrated for the first time that *in vitro* exposure to high doses of DEX impairs human fetal oogenesis through an increase in apoptosis. These data are of high importance, and additional epidemiological studies are required to investigate the female fertility of those women who have been exposed to DEX during fetal life. (***J Clin Endocrinol Metab* 97: E1890–E1897, 2012**)

Drug exposure during pregnancy may have an impact on the future of adult fertility, as widely described by alterations in reproductive functions after exposure to diethylstilbestrol (1). Although the benefit/risk balance is usually assessed before starting a treatment, some pathologies will inevitably require the use of drugs during pregnancy. This is the case for the administration of glucocorticoids (GC).

GC are involved in the final maturation of fetal organ systems and modulate inflammatory and immune responses (2). The biological response of GC is mediated

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.
Copyright © 2012 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/jc.2012-1681 Received March 14, 2012. Accepted June 27, 2012.
First Published Online July 16, 2012

Abbreviations: BrdU, 5-Bromo-2′-deoxyuridine; DEX, dexamethasone; GC, glucocorticoids; HRE, hormone response element; KIT, v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; NR3C1, nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1; OCT4, octamer-binding transcription factor-4; 21-OHD, 21-hydroxylase deficiency; PR, progesterone receptor; wpf, wk post fertilization.

through the nuclear GC receptor [nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (NR3C1) (3). Approximately 7% of pregnant women in Europe and North America are treated with dexamethasone (DEX) to promote lung maturation in fetuses at risk of preterm delivery and to prevent respiratory distress syndrome (4). Maternal DEX administration is frequently used in congenital adrenal hyperplasia like 21-hydroxylase deficiency (21-OHD). This group of genetic disorders leads to impaired enzyme function required for cortisol production, which exposes the fetus to elevated precursors and androgens. However, the efficiency of DEX treatment to prevent virilization of female fetuses is controversial. The classic form of 21-OHD can be of salt-wasting or simple-virilizing type. Epidemiological data analyses have demonstrated an overall incidence of this form of one in 15,000 live births (5), and about 75% of patients have the salt-wasting phenotype. Nonclassical 21-OHD is much more common than the classical form, with an ethnic-specific prevalence and an incidence as high as one in 27 in Ashkenazi Jews (6) and is associated with hyperandrogenemia. Prenatal treatment of 21-OHD with DEX has now been used since 1978 in France and 1986 in the United States (7). It has to be started before 9 wk post fertilization (wpf), before the onset of adrenal androgen secretion, at the dose of 20 μg/kg·d up to the delivery, to prevent virilization of female fetuses (8). Dexamethasone is used because of a long half-life of elimination and a minimal binding to maternal blood proteins, and unlike maternal endogenous GC, it escapes inactivation by the placental 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

Oogenesis is initiated during fetal life, and the development of the ovary determines, in part, future adult fertility. In the fetal human ovary, oogonia initially display a high mitotic activity (9) until around 12 wpf when the first signs of meiosis initiation are apparent (10, 11). Although increasing numbers of germ cells initiate meiosis, a pool of oogonia carry on proliferating until at least 16–20 wpf. At around 20 wpf, some dictated oocytes become enclosed into primordial follicles. In humans, the loss of oocytes is particularly extensive; around 70% of the 7×10^6 potential oocytes in a 14-wk-old fetus are already lost by birth, and more than 95% are lost at the beginning of puberty (12). This massive, constitutive germ cell death depends on the genetic machinery of apoptosis (13). Because the ovary contains a fixed number of nongrowing follicles at birth, the balance between apoptosis and proliferation during fetal ovarian development represents a major phenomenon in establishing maximal potential adult fecundity in women.

Knowing that GC regulate genes involved in cell death induction (14), it is conceivable to consider germ cells as a possible target of DEX. Very few studies have investigated the effects of DEX treatment on the germline. In the rodent adult testis, DEX has been proposed to impair testicular germ cells through the induction of germ cell apoptosis, mediated by tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6(FasL)/B-cell CLL/lymphoma 2 associated X protein (Bax) signaling (15–17). However, data on the DEX effect on the development or function of the ovary are limited, and the GC receptor NR3C1 has been described to be expressed and functional in adult rodent ovaries (18). It has also been shown that high doses of DEX hamper follicle differentiation and oocyte maturation in mouse ovaries (19). Furthermore, in the developing rodent gonads, other studies have reported that DEX decreased testosterone production in the testis (20) and potentiated adverse effects of environmental chemicals (21). Also, DEX has been shown to decrease postnatal follicle count in the rat ovary (22). To our knowledge, no study has ever investigated the effect of DEX on human embryonic ovaries.

Several large human studies involving the use of DEX as prenatal treatment for 21-OHD demonstrated that it did not have teratogenic effects when used according to the usual protocol (23–25). However, the effect of DEX on the ovary has not been studied in detail, and the long-term fertility of the women exposed *in utero* is unknown, since DEX treatment was initiated less than 30 yr ago. Based on GC-induced apoptosis observed in various cell types, we hypothesized that DEX treatment during pregnancy may impair the development of the human germline. We have thus conducted an experimental study that aimed to test the *in vitro* effect of DEX on the human fetal ovary. We report here that a significant increase in germ cell apoptosis was induced by DEX.

Materials and Methods

Collection of human fetal ovaries

Human fetal ovaries were harvested from material available after legally induced abortions carried out in the first trimester of pregnancy and therapeutic termination of pregnancy in the second or third trimester, *i.e.* from the sixth to the 22nd wk after conception, in the Department of Obstetrics and Gynecology at the Antoine Béclère Hospital, Clamart (France) as previously described (26, 27). None of the induced abortions were practiced for reasons of fetal abnormality, and all fetuses appeared morphologically normal. The fetal ovaries from the therapeutic termination of pregnancies had to meet a normal histology feature before they were included in our research trial.

Our study was approved by the Biomedicine Agency, and all women gave their informed consent. The sex of the fetus was determined from the morphology of the gonads and confirmed by histological analysis of the gonad. Ovaries were thinner and more closely associated with the mesonephros than testes. The fetal age was evaluated by measuring the length of limbs and feet (28). Fetal ovaries were then prepared for organ culture or stocked in RNeasy Lysis Buffer (−80 C) (QIAGEN, Courtaboeuf, France) for gene expression profiling.

Organ culture

All tissues were cultured on Millicell-CM Biopore membranes (pore size 0.4 μm; Millipore, Billerica, MA) in 0.3 ml Ham's F12/DMEM (1:1) containing 80 μg/ml gentamicin in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO_2 at 37 C. The medium was changed every 48 h. Human ovaries were cut into small pieces before being placed separately on Millicell membranes. The vehicle (absolute ethanol) was also included in the culture medium of the paired control. The allocation of human ovary pieces into control or experimental conditions was carried out at random for each ovary.

For histology and immunohistochemistry studies, part of the ovaries was cultured in the absence or in the presence of DEX (2, 10, or 50 μM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or in the presence of DEX (10 μM) plus progesterone (0.32 μM) for 14 d.

For the gene regulation study, part of the ovaries was used as a control and the rest cultured in the presence of DEX (50 μM) or DEX (10 μM) plus progesterone (0.32 μM), for either 6 h or 6 d, depending on the studied genes.

Immunohistochemistry

Pieces of human ovaries were fixed in Bouin's fluid at the end of the culture. For NR3C1 localization, tissues were incubated with or without DEX (50 μM) and then fixed in 4% paraformaldehyde. The fixed tissues were dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5-μm-thick sections.

Immunohistochemistry, based on peroxidase activity, was performed using commercially available primary antibodies: anti-NR3C1 (GC receptor, 1/10, mouse monoclonal antibody; Eurobio, Courtaboeuf, France), anti-KIT (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) (1/200, goat polyclonal antibody, M14; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and anti-cleaved caspase-3 Asp 175 (1/100; Cell Signaling, Saint Quentin Yvelines, France). Five tissue sections per ovary were mounted onto glass slides, dewaxed, and boiled for 10 min in 10 mM Tris (pH 10.6) for immunostaining of cleaved caspase-3 or in 10 mM citrate (pH 6.0) for immunostaining of NR3C1 or KIT. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 min. The sections were washed with PBS and blocked for 30 min with 10% BSA. Slides were incubated overnight at 4 C with the primary antibody, detected with a species-specific secondary antibody conjugated with a peroxidase activity polymer (ImmPRESS reagent kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). For all experiments, peroxidase activity was visualized using 3,3′-diaminobenzidine (brown) as substrate. Histolab analysis software (Microvision Instruments, Evry, France) was used.

Measurement of germ cell density and cell proliferation

Ovarian sections (one in every 10 serial sections) were dewaxed, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin. Germ cells on each section were identified on the basis of their large spherical nuclei and clearly visible cytoplasmic membrane and counted. Normalization was achieved by dividing the number of germ cells in each fragment by the area to obtain a germ cell density. Furthermore, (Pit-Oct-Unc) class 5 homeobox 1 [octamer-binding transcription factor-4 (OCT4)] was used to confirm the germ cell feature in each condition and detected by immunohistochemistry using an anti-OCT4 antibody (1/200, Santa Cruz Biotechnology, CA).

The percentage of cells in S-phase or in apoptosis was evaluated by immunohistochemical methods. We measured 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) incorporation, using a cell proliferation kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's recommendations. BrdU (1%) was added at the end of the culture period for 3 h before tissue fixation. Briefly, three to five randomly selected sections were mounted, rehydrated, and incubated for 1 h with mouse anti-BrdU antibody and with a peroxidase-linked antimouse IgG. Peroxidase activity was then detected by 3,3′-diaminobenzidine. The BrdU incorporation index was determined by the counting (blinded to experimental group) of at least 500 germ cells (stained or unstained).

Real-time quantitative PCR

Total RNA from the whole gonad, at the end of the culture period, was extracted using the RNeasy mini kit (QIAGEN), and reverse transcription was carried out with the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

The 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) and SYBR-green or TaqMan labeling were used for quantitative RT-PCR. The comparative cycle threshold method was used to determine the relative quantities of mRNA. β-Actin was used as the endogenous reporter. All efficiencies were between 95 and 100%. Each RNA sample was run in duplicate, and all valid primers were used at a final concentration of 400 nM. Sequences of oligonucleotides used with SYBR-green detection were designed with Primer Express software (Table 1).

Statistical analysis

All values are expressed as means ± SEM. Graphics shown in the figures are representative of at least three experiments. Data were analyzed using paired Student's *t* test when a single treatment was performed (see Figs. 1D, 2C, and 4A). Other mean values were compared using one-way ANOVA (see Figs. 1E, 2A, and 3) with GraphPad Instat version 3.06.

Correlation between DEX concentration and germ cell density was carried out using the Pearson's test (see Fig. 2A) Statistical significances were set at $P < 0.05$.

TABLE 1. Quantitative RT-PCR primer sequences

Gene	Primer sequences (5′–3′)
Human β-actin	
Forward	TGACCCAGATCATGTTTGAGA
Reverse	TACGGCCAGAGGGGTACAGC
Human *NR3C1*	
Forward	TTCCCTGGTCGAACAGTTTT
Reverse	TGTTGTTGCTGTTGAGGAGC
Human *PLZF*	
Forward	GCTTCCTGATAACGAGGCTG
Reverse	CCGCTGAATGAGCCAGTAA
Human *FKBP5*	
Forward	GCGGAGAGTGACGAGTC
Reverse	TGGGGCTTTCTTCATTGTTC
Human *KIT*	Applied Biosystems probe accession no. Hs00174029-A1
Human *NR3C1α*	
Forward	GAAGGAAACTCCAGCCAGAACTG
Reverse	GATGATTTCAGCTAACATCTCG
Human *NR3C1β*	
Forward	GAAGGAAACTCCAGCCAGAACTG
Reverse	TGAGCGCCAAGATTGTTGG

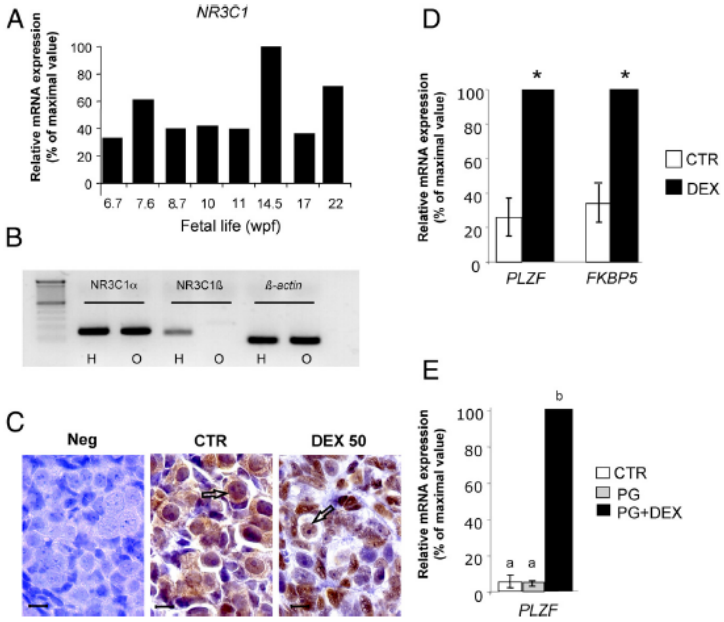


FIG. 1. GC receptor is expressed and active in human fetal ovaries. A, *NR3C1* gene expression was measured by quantitative RT-PCR in human fetal ovaries. Fetal ovaries were harvested at the indicated development stage (n = 3 for 6.7, 7.6, 8.7, 10, and 11 wpf; n = 1 for 14.5 and 17 wpf, and n = 2 for 22 wpf). B, *NR3C1* gene expression for isoforms α (*NR3C1α*) and β (*NR3C1β*) measured by RT-PCR in positive control cell line HEK 293 (H) and human fetal ovary of 11 wpf (O). A 100-bp ladder was used. C, Human fetal ovary (9.2 wpf) incubated without [control (CTR)] or with 50 μM DEX (DEX 50) for 30 min. *Open arrows* indicate germ cells positive for *NR3C1* detected by immunohistochemistry. *Scale bar*, 10 μm. On the *left*, the negative control (Neg) was obtained by incubating sections without first antibody. D, *PLZF* and *FKBP51* gene expression levels were assessed by quantitative RT-PCR in fetal ovaries cultured for 6 h without (*white bar*; n = 6) or with 50 μM DEX (*black bar*; n = 6). Six fetal ovaries ranging from 7.4–10.2 wpf were included in this experiment. *, $P < 0.05$ in the paired Student's *t* test comparisons with control. E, *PLZF* gene expression was assessed by quantitative RT-PCR in fetal ovaries cultured for 6 h without (*white bar*; n = 3) or with 0.32 μM progesterone (PG) (*gray bar*; n = 3) or 10 μM DEX plus 0.32 μM progesterone (*black bar*; n = 3). Fetal ovaries included were at 7.8–10.2 wpf. Gene (mRNA) expression levels were normalized against β-actin. *Different letters* represent significantly different values in ANOVA comparisons, with $P < 0.05$.

For gene expression, statistical analyses were carried out using raw change in cycle threshold values. Data were later converted to percentage of maximal value for each gene (see Figs. 1, D and E, and 4A).

Results

GC receptor is expressed and active in human fetal ovaries

NR3C1 gene expression was analyzed in human fetal ovaries according to development stage and revealed the presence of GC receptor (Fig. 1A). Comparable expression levels were observed between different developmental stages from 6.7–22 wpf. To specify which subtype (α and/or β) of the receptor was expressed in fetal ovaries, the expression of the two isoforms was assessed. At all stages studied (from 6–22 wpf), we have been unable to detect the expression of the β-isoform by RT-PCR, whereas the α-subtype was strongly expressed in the human fetal ovary (data not shown and Fig. 1B for 11-wpf ovaries).

Using immunohistochemistry, we detected NR3C1 protein both in germ and somatic cells (Fig. 1C). Furthermore, to ensure the specificity of the signal, we incubated a fetal ovary in the presence of DEX (50 μM) for 30 min; under this condition, we observed a clear shift of the staining toward the nuclear compartment. In all sections studied, NR3C1 was ubiquitously expressed and the staining in germ cells presented a variable intensity with cells barely labeled up to cells displaying a robust staining without any correlation with the age or the localization within the ovaries.

To assess whether the GC receptor was indeed functional in fetal ovaries, we investigated the effect of a 6-h DEX treatment on the expression of two known GC-target genes: the FK506-binding protein (*FKBP5*) (29) and the zinc finger and BTB domain containing 16 (ZBTB16 also named *PLZF*) (30) (Fig. 1D). Both genes responded to DEX treatment with a significant mRNA increase compared with control, confirming that the GC receptor was present and functional in human fetal ovaries.

Embryonic gonads are exposed to high levels of progesterone during pregnancy. Because *PLZF* can be induced by progesterone in both endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells (30), we wanted to clarify whether progesterone compromises the effect of DEX on *PLZF* expression. As shown in Fig. 1E, the 6-h exposure to progesterone alone did not increase *PLZF* expression compared with control samples. However, DEX strongly stimulated *PLZF* in the presence of progesterone.

DEX decreased germ cell density in human fetal ovaries

After 14 d organ culture, we investigated the effect of DEX on germ cells. As shown in Fig. 2A, DEX significantly decreased germ cell density by 26 and 46% at the 10 and 50 μM doses, respectively. Furthermore, we observed a

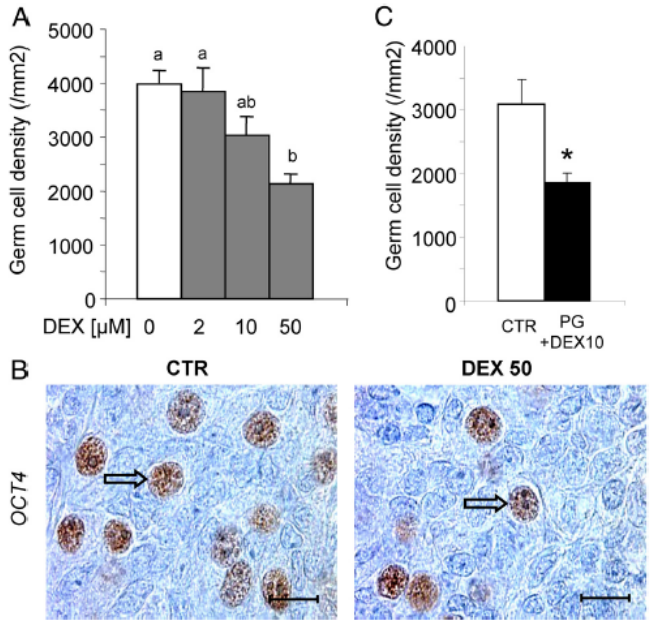


FIG. 2. DEX decreased germ cell density in human fetal ovaries. A, Human fetal ovaries (n = 6) ranging from 7.3–10.8 wpf were cultured without (control) or with DEX for 14 d. Each *bar* represents the mean ± SEM of six cultures. *Different letters* represent significantly different values in ANOVA comparisons, with $P < 0.05$. B, *Open arrows* indicate germ cells positive for OCT4 detected by immunohistochemistry. The *bar* represents 10 μm. C, Human fetal ovaries (n = 3) ranging from 6.9–8.6 wpf were cultured without (*white bar*) or with 10 μM DEX plus 0.32 μM progesterone (PG) (*black bar*). *, $P < 0.05$ in the paired Student's *t* test comparisons with control. CTR, Control.

robust negative correlation between DEX concentration and germ cell density ($\rho = -0.70$; $P = 0.0002$ with the Pearson correlation test). The negative effect of DEX was further shown histologically by staining of the germ cell marker OCT4 (Fig. 2B). Interestingly, treatment with both DEX (10 μM) and progesterone further reduced the germ cell density (39%) when compared with DEX (10 μM) alone (Fig. 2C).

Dexamethasone increases apoptotic rate of oogonia

To determine whether the DEX-induced reduction of germ cell density originated from an alteration in proliferation or apoptosis of germ cells, the oogonial proliferative rate was assessed by measuring BrdU incorporation. After 14 days' organ culture, about 30% of the germ cells incorporated BrdU during a 3 h period (Fig. 3A). No significant difference was observed between control and DEX-exposed ovaries, whatever the concentration used. Apoptotic germ cells were identified as large cells that stained for cleaved caspase-3. Only the highest DEX concentration used (50 μM) significantly amplified germ cell apoptosis (5.4 ± 2.1% *vs.* 2.1 ± 0.8% in control) leading to a 2.9-fold increase (Fig. 3B).

DEX exposure decreased KIT expression in human fetal ovaries

The v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (*KIT*) has been proven to be both a gene repressed by *PLZF* and a gene crucial for germ cell survival in the mouse. We therefore investigated the effect of DEX on *KIT* expression after 6 d organ culture with or without 50 μM DEX. DEX significantly decreased the *KIT* expression level by 33% (Fig. 4A). Immunostaining against KIT protein evidenced fewer germ cells presenting a clear signal in the DEX-treated ovaries (Fig. 4B).

Discussion

This work is the first experimental demonstration of the potential deleterious effect that DEX exposure has on the human female fetal germline. Using organ culture, we demonstrated that DEX both decreased the germ cell density and increased the apoptotic rate of germ cells without affecting their proliferation rate. Thus, DEX most likely decreased the number of germ cells in the human fetal ovary and potentially at birth.

Altogether we have shown that the GC receptor *NR3C1* was expressed and active after DEX treatment in the developing ovary. Alternative splicing of exon 9 of the *NR3C1* gene results in the synthesis of two protein isoforms (α and β) with NR3C1β being unable to bind the ligand. In the human fetal ovary, we demonstrated that only NR3C1α was produced. The activity of the NR3C1 receptor was evidenced both by its translocation to the nucleus and by the expression of known target genes in response to DEX treatment. Among the NR3C1 target genes, we report here for the first time the expression of *PLZF* in an embryonic mammalian ovary. These data are of particular interest because *PLZF* is known to be the gatekeeper gene of male germ stemness (31, 32) and can be used as a specific marker of stem/immature progenitor in the fetal testis in mice (33). In the mouse adult testis, *PLZF* has been demonstrated to directly repress *KIT* expression (34). This is in accordance with our data, which showed

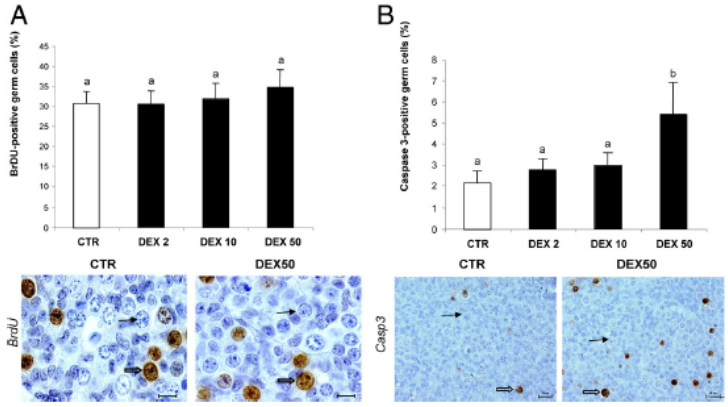


FIG. 3. Oogonial proliferative and apoptotic rates after DEX exposure. Human fetal ovaries ranging from 7.3–10.8 wpf were cultured with or without DEX for 14 d. Each column is the mean ± SEM of six cultures. *Different letters* represent significantly different values in ANOVA comparisons, with $P < 0.05$. Incorporation of BrdU (A) and cleaved-caspase3 (Casp3) (B) was detected by immunohistochemistry. *Black arrows* indicate negative and *open arrows* positive germ cells. *Scale bar*, 10 μm for BrdU and 20 μm for Casp3.

that DEX both induced *PLZF* and decreased *KIT* expression levels. *KIT* is well known to be required for primordial germ cell survival both in the mouse and human (35–37). In this regard, a decrease in *KIT* expression was likely to contribute to the DEX-induced germ cell apoptosis. This hypothesis fits well with our observation of a specific effect of DEX on oogonial apoptosis, as we have shown by the presence of cleaved-caspase 3 in DEX-treated germ cells that resulted in a decrease in germ cell number. Although no obvious increase of cleaved-caspase 3 was detected at the 10 μM dose, germ cell density was decreased at this dose. We hypothesize that this apparent discrepancy is due to the germ cell density being a more sensitive indicator because it sums up cell death that occurred during the whole culture period, whereas the detection of apoptotic marker represents cellular events only at a given instant. On the other hand, one may also consider that DEX can induce cell death in a caspase-independent manner.

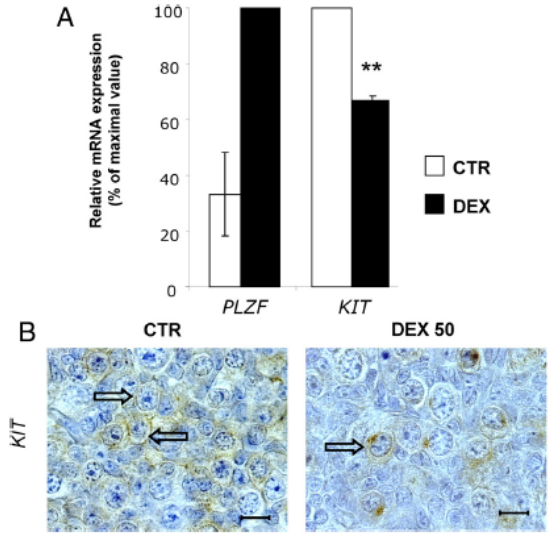


FIG. 4. Dexamethasone exposure decreased *C-KIT* expression in human fetal ovaries. A, *PLZF* and *C-KIT* gene expression was assessed by quantitative RT-PCR in fetal ovaries cultured over 6 d without (*white bar*; n = 3) or with 50 μM DEX (*black bar*; n = 3). Three human fetal ovaries ranging from 7–9 wpf were included in this experiment. **, Significantly different with *P* value = 0.00329 *vs.* control in the paired Student's *t* test with. Gene (mRNA) expression was normalized against β-actin. B, *Open arrows* indicate germ cells positive for *KIT* detected by immunohistochemistry. *Scale bar*, 10 μm.

To date, only one study described an effect of DEX on the ovary during fetal life (22). This study reported that, in the rat, DEX exposure during late pregnancy decreased the offspring's pool of follicles, observed shortly after birth (sc 1.0 mg DEX/kg body weight). This *in vivo* report is in accordance with our *in vitro* data using a human fetal ovary, because DEX treatment in the rat was initiated at 16 d after conception, when most germ cells are still at the oogonial stage.

Interestingly, progesterone potentiated the effect of DEX treatment in human fetal ovaries. During the first trimester of pregnancy, progesterone receptor (PR) was expressed at very low levels in human embryonic ovaries (38) (personal observation). This may explain why progesterone alone was unable to stimulate *PLZF* expression by itself as demonstrated in endometrial tissues that expressed a high level of PR (30). However, low levels of PR may act synergistically with NR3C1 because both can bind the same hormone response element (HRE) (39). In this regard, the effect of low doses of DEX in combination with progesterone naturally present during pregnancy requires serious consideration, although future studies will be required to clarify the exact molecular mechanisms involved.

We have shown that the deleterious effect of DEX alone *in vitro* was observed only starting from the 10 μM dose. Previous *in vitro* studies using other human primary cells, such as lens epithelial cells and tenocytes, have also described a DEX-induced cell death, with doses ranging from 1–100 μM (40, 41). The comparison between doses used *in vitro* and the expected *in vivo* exposure is hard to perform because few *in vivo* data are available, especially during pregnancy. However, a pharmacokinetic evaluation of DEX carried out by Loew *et al.* (42) described a

maximal serum concentration of 13.9 ng/ml (about 35 μM) after a 1.5-mg oral administration. Moreover, it is difficult to assume the possible consequences of a longer exposure because our study was limited to 2 wk, whereas the proliferation of the human oogonia *in vivo* is observed for more than 14 wk (*i.e.* starting at 6 wpf and ending after 20 wpf). Two clinical protocols have to be considered due to the potential different deleterious effects of administering DEX. First, to promote lung maturation in preterm delivery, one high-dose bolus is administered late during fetal life, around 26 wpf, when few oogonia are still detectable (personal observation). The long-term treatment of 21-OHD deficiency starts before 9 wpf, resulting in an exposure to DEX during the window of development for the fetal ovary. The effects of DEX treatment during a short or long exposure and/or according to the age of the ovary at the time of administration require further research.

In conclusion, altogether our data indicate that DEX alone or in the presence of progesterone induced germ cell apoptosis in the human fetal ovary *in vitro*. Whether DEX has the same effect *in vivo* and the consequences of such a loss of germ cell require additional investigations. In particular, epidemiological studies will be of the utmost importance. DEX treatment during pregnancy started in the early 1980s. If exposure of female fetuses to DEX compromises the oogonial stock and thus constitutes a risk factor of developing premature ovarian failure, an epidemiological study will need to be conducted in the coming years. Indeed, the first of these women are below 30 yr old, whereas premature ovarian failure is defined as a malfunction of the ovary before 40 yr of age.

Acknowledgments

We are grateful to the staff within the department of Obstetrics and Gynecology of the Antoine Béclère Hospital (Clamart, France), in particular S. Pozzi who delivered information to patients who consented to the use of their fetuses for research. We thank Dr. V. Muczinski for his technical assistance to harvest fetal ovaries, Dr. M. Lombès and G. Meduri for their invaluable help with the *NR3C1* IHC protocol, S. Messiaen for his invaluable help with the OCT4 IHC protocol, A. Gouret for her skillful secretarial assistance, and AngloScribe (Calvisson, France) for English language editing. Additionally, we thank J. Benardino-Sgherri and B. Souquet for their critical reading of the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Nelly Frydman, Laboratoire de Développement des Gonades Batiment 05 Porte A011B Commissariat à l'Energie Atomique-DSV/iRCM/SCSR/LDG Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. E-mail: nelly.frydman@abc.aphp.fr.

This work was supported by the University Paris-Diderot (Paris VII), Paris-Sud (Paris XI), Commissariat à l'Energie Atomique, and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. **Hoover RN, Hyer M, Pfeiffer RM, Adam E, Bond B, Cheville AL, Colton T, Hartge P, Hatch EE, Herbst AL, Karlan BY, Kaufman R, Noller KL, Palmer JR, Robboy SJ, Saal RC, Strohsnitter W, Titus-Ernstoff L, Troisi R** 2011 Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. N Engl J Med 365:1304–1314
2. **Michael AE, Papageorghiou AT** 2008 Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. Hum Reprod Update 14:497–517
3. **Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS** 2000 Glucocorticoids in T cell development and function. Annu Rev Immunol 18:309–345
4. **Marciniak B, Patro-Małysza J, Poniedziałek-Czajkowska E, Kimber-Trojnar Z, Leszczyñska-Gorzelak B, Oleszczuk J** 2011 Glucocorticoids in pregnancy. Curr Pharm Biotechnol 12:750–757
5. **Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S** 1988 Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Pediatrics 81:866–874
6. **Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI** 1985 High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet 37:650–667
7. **David M, Forest MG** 1984 Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia resulting from 21-hydroxylase deficiency. J Pediatr 105:799–803
8. **Lo JC, Schwitzgebel VM, Tyrrell JB, Fitzgerald PA, Kaplan SL, Conte FA, Grumbach MM** 1999 Normal female infants born of mothers with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 84:930–936
9. **Bendsen E, Byskov AG, Andersen CY, Westergaard LG** 2006 Number of germ cells and somatic cells in human fetal ovaries during the first weeks after sex differentiation. Hum Reprod 21:30–35
10. **Gondos B, Westergaard L, Byskov AG** 1986 Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. Am J Obstet Gynecol 155:189–195
11. **Le Bouffant R, Guerquin MJ, Duquenne C, Frydman N, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Frydman R, Habert R, Livera G** 2010 Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. Hum Reprod 25:2579–2590
12. **Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF** 1991 Morphometric study of the human neonatal ovary. Anat Rec 231:201–208
13. **Tilly JL** 1996 Apoptosis and ovarian function. Rev Reprod 1:162–172
14. **Robertson NM, Bodine PV, Hsu TC, Alnemri ES, Litwack G** 1995 Modulator inhibits nuclear translocation of the glucocorticoid receptor and inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in the human leukemic cell line CEM C-7. Cancer Res 55:548–556
15. **Yazawa H, Sasagawa I, Nakada T** 2000 Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. Hum Reprod 15:1917–1920
16. **Orazizadeh M, Khorsandi LS, Hashemitabar M** 2010 Toxic effects of dexamethasone on mouse testicular germ cells. Andrologia 42:247–253
17. **Orazizadeh M, Hashemitabar M, Khorsandi L** 2009 Protective effect of minocycline on dexamethasone induced testicular germ cell apoptosis in mice. Eur Rev Med Pharmacol Sci 13:1–518
18. **Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF** 1982 Rat ovary glucocor-

ticoid receptor: identification and characterization. Steroids 39: 569–584
19. **Van Merris V, Van Wemmel K, Cortvrindt R** 2007 In vitro effects of dexamethasone on mouse ovarian function and pre-implantation embryo development. Reprod Toxicol 23:32–41
20. **Lalau JD, Aubert ML, Carmignac DF, Grégoire I, Dupouy JP** 1990 Reduction in testicular function in rats. II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. Neuroendocrinology 51:289–293
21. **Drake AJ, van den Driesche S, Scott HM, Hutchison GR, Seckl JR, Sharpe RM** 2009 Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. Endocrinology 150:5055–5064
22. **Ristiæ N, Nestoroviæ N, Manojloviæ-Stojanoski M, Filipoviæ B, Sosiæ-Jurjeviæ B, Miloseviæ V, Sekuliæ M** 2008 Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. J Microsc 232:549–557
23. **Mercado AB, Wilson RC, Cheng KC, Wei JQ, New MI** 1995 Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 80:2014–2020
24. **Lajic S, Wedell A, Bui TH, Ritzén EM, Holst M** 1998 Long-term somatic follow-up of prenatally treated children with congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 83:3872–3880
25. **New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A, Lin-Su K, Putnam AS, Wei JQ, Wilson RC** 2001 Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. J Clin Endocrinol Metab 86:5651–5657
26. **Lambrot R, Coffigny H, Pairault C, Donnadieu AC, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V** 2006 Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. J Clin Endocrinol Metab 91:2696–2703
27. **Guerquin MJ, Duquenne C, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Lambrot R, Bakalska M, Frydman R, Habert R, Livera G** 2009 Sex-specific differences in fetal germ cell apoptosis induced by ionizing radiation. Hum Reprod 24:670–678
28. **Evtouchenko L, Studer L, Spenger C, Dreher E, Seiler RW** 1996 A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. Cell Transplant 5:453–464
29. **U M, Shen L, Oshida T, Miyauchi J, Yamada M, Miyashita T** 2004 Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. Leukemia 18:1850–1856
30. **Fahnenstich J, Nandy A, Milde-Langosch K, Schneider-Merck T, Walther N, Gellersen B** 2003 Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) is a glucocorticoid- and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells. Mol Hum Reprod 9:611–623
31. **Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE** 2004 Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. Nat Genet 36:647–652
32. **Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP** 2004 Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. Nat Genet 36: 653–659
33. **Moreno SG, Attali M, Allemand I, Messiaen S, Fouchet P, Coffigny H, Romeo PH, Habert R** 2010 TGFβ signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. Dev Biol 342: 74–84
34. **Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, Pandolfi PP, Dolci S** 2007 Repression of kit expression by Plzf in germ cells. Mol Cell Biol 27:6770–6781
35. **Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T, Nishikawa S** 1991 Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. Development 113:689–699
36. **Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL** 1991 Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. Nature 353:750–752
37. **Robinson LL, Gaskell TL, Saunders PT, Anderson RA** 2001 Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. Mol Hum Reprod 7:845–852
38. **Fowler PA, Anderson RA, Saunders PT, Kinnell H, Mason JI, Evans DB, Bhattacharya S, Flannigan S, Franks S, Monteiro A, O'Shaughnessy PJ** 2011 Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. J Clin Endocrinol Metab 96:1754–1762
39. **Umesono K, Evans RM** 1989 Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. Cell 57:1139–1146
40. **Petersen A, Carlsson T, Karlsson JO, Jonhede S, Zetterberg M** 2008 Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture. Mol Vis 14:1344–1352
41. **Wong MW, Lui WT, Fu SC, Lee KM** 2009 The effect of glucocorticoids on tendon cell viability in human tendon explants. Acta Orthop 80:363–367
42. **Loew D, Schuster O, Graul EH** 1986 Dose-dependent pharmacokinetics of dexamethasone. Eur J Clin Pharmacol 30:225–230

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse a été d'essayer d'éclaircir la voie de différenciation des CG ovariennes chez la femme, ses mécanismes et leurs perturbations possibles. Depuis plus de 2000 ans, les savants cherchent à percer les mystères de la Reproduction et de la pérennisation de l'espèce. De nombreux travaux anatomiques puis histologiques ont permis de décrire les organes reproducteurs, puis les gamètes et le système hormonal régulant leur formation. L'essor de la génétique et des techniques de biologie moléculaire a permis d'étudier amplement la mise en place de la lignée germinale chez plusieurs modèles (cellulaires, végétaux et animaux). Le terrain assez « vierge » et vaste chez l'Homme au moment de l'initiation du projet nous laissait de multiples possibilités. Nous avons choisi de nous focaliser sur la période fœtale de la mise en place de la lignée germinale. De notre avis, cette période est cruciale, car 'au commencement de tout'. Les toutes premières cellules à l'origine de la lignée germinale se différencient dans les premiers jours de développement embryonnaire et ne seront utiles que des dizaines d'années plus tard. Le développement de la lignée germinale est long puisque sa mise en place commence pendant la vie fœtale et se poursuit à l'âge adulte. En comparaison, les 9 mois passés *in utero* représentent peu de temps alors qu'au cours de cette période, la lignée germinale subit de multiples évènements (induction et spécification des CGP, migration et multiplication, colonisation de la gonade et engagement dans un destin germinal) et se différencie sexuellement pour finalement rester en diapause au stade ovocyte chez la femelle ou en pseudo-quiescence chez le mâle de la fin de vie fœtale jusqu'à la puberté. Tous ces évènements peuvent être la cible de perturbations pouvant se répercuter sur la compétence de la lignée germinale et donc la fertilité de l'individu à l'âge adulte. Nous avons choisi de nous focaliser plus particulièrement sur la transition mitose/méiose dans la lignée femelle. Pourquoi une CG XX initie-t-elle la méiose en vie fœtale alors que les CG XY restent mitotiques ou quiescentes ? Pourquoi la différenciation des CG est-elle asynchrone dans l'ovaire humain et pourquoi certaines CG ovariennes semblent échapper à cette différenciation ? Comprendre ces mécanismes fondamentaux nous permet d'améliorer nos connaissances sur le développement des gonades humaines et permettra, nous espérons, d'éviter les perturbations, voire peut-être un jour réparer des défauts de différenciation à l'origine d'infertilités et de stérilités.

Nos travaux fondamentaux sur le développement de la lignée germinale humaine confirment d'une part les nombresuses divergences entre le développement gonadique murin et humain et d'autre part qu'il est réalisable et important d'étudier les spécificités humaines afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des futurs gamètes.

Malheureusement, à ce jour, les connaissances demeurent limitées chez l'Homme :

- les tissus fœtaux sont difficiles d'accès et nous manquons d'outils d'étude. La recherche dans cette thématique nous permettra de développer de nouveaux outils.

- parmi les étapes-clés du développement ovarien, le contrôle de l'entrée en méiose, ou son échappement (persistance de cellules souches) dans l'ovaire humain nous a particulièrement intéressé. En comprendre les mécanismes nous permettra de mieux définir la CG femelle ou mâle.

Ces deux points constitueront le fil conducteur des trois parties de la discussion : les modèles d'étude, l'apport scientifique de nos travaux, les conséquences de ces résultats et les perspectives envisagées.

1. Les modèles d'études

Dans la plupart des modèles d'étude, et notamment chez la souris, les gonades sont facilement obtenues et à des stades de développement choisis (accouplements datés). Il est possible, dans ces modèles, d'invalider des gènes d'intérêts ou d'administrer des substances pouvant perturber les mécanismes étudiés. Le matériel fœtal humain est difficile d'accès car est issu d'interruptions de grossesses volontaires ou thérapeutiques. La recherche sur les produits d'IVG/IMG est soumise en France à réglementation et nécessite la coordination de plusieurs équipes hospitalières et scientifiques. Grâce à une collaboration avec le service de Gynécologie-obstétrique de l'Hôpital Antoine Béclère à Clamart, nous avons la chance de disposer de gonades humaines. L'invalidation génique avant le développement des gonades humaines n'est bien sûr pas possible chez l'Homme (fort heureusement !) et la preuve formelle d'un mécanisme n'est possible que lorsqu'une mutation ou un défaut dans une voie de signalisation est identifiée chez un patient. C'est pourquoi, à ce jour, la connaissance des étapes de mise en place de la lignée germinale demeure limitée et qu'il est nécessaire de développer des modèles d'étude des CG humaines. De plus, le matériel fœtal tardif issu d'IMG est très rare et l'indication médicale d'interruption de la grossesse peut présenter un risque sous-jacent d'interference avec les résultats de l'étude (pathologie pouvant affecter le développement de l'organe étudié).

Plusieurs approches expérimentales ont été utilisées au cours de ces travaux de thèse pour approfondir nos connaissances fondamentales sur la lignée germinale ovarienne. Des analyses histologiques, immunohistochimiques ou d'expression de gènes par RT-qPCR dans des ovaires natifs de 6,4 à 35 sg ont permis de caractériser plus extensivement les CG ovariennes à différents stades du développement fœtal. Ces analyses ont permis d'ériger l'ontogénèse de nombreux marqueurs de CG décrits chez la souris. Certains marqueurs comme *NANOG*, *OCT4*, *SSEA1*, *DDX4* ou *STRA8* avaient déjà été décrits chez l'Homme (Stoop et al., 2005; Kerr et al., 2008b; Anderson et al., 2007; Le Bouffant et al., 2010) et ont pu être confirmés et leur caractérisation approfondie. D'autres comme *DMRTA2*, *PLZF* ou *NR3C1*, ont été rapportés dans l'ovaire fœtal humain pour la première fois (Résultats 1, 2 et 3). Cette caractérisation est essentielle pour i) comparer le développement humain aux autres modèles, ii) approfondir les connaissances fondamentales et iii) orienter les analyses mécanistiques vers une voie en particulier.

Ces travaux préliminaires de caractérisation ont ensuite été complétés par l'utilisation d'un modèle de culture organotypique de gonades fœtales, déjà mis en place au Laboratoire (Lambrot et al., 2006). Grâce à une oxygénation et une hydratation maîtrisée de l'organe, la culture organotypique permet le développement des cellules germinales et somatiques sans aucun facteur additionnel. L'architecture de l'organe étant conservée, les signaux paracrines intercellulaires et les voies de signalisation peuvent être explorés ce qui permet une approche d'étude plus fondamentale et la culture sur milieu synthétique pur facilite l'interprétation des effets observés. L'ajout d'inhibiteurs connus d'une voie de signalisation ou d'une substance à tester à différentes concentrations est possible. Une exposition de l'organe à de multiples drogues peut également être réalisée. Les effets des rétinoïdes (Lambrot et al., 2006) et l'impact des rayonnements ionisants (Lambrot et al., 2007) sur le testicule fœtal humain, les effets chez l'Homme et le rongeur de l'exposition de testicules fœtaux à des perturbateurs endocriniens comme le DES ou des phénols (Myllymaki et al., 2005), le MEHP et le BPA (pour revue Habert et al., 2014) ont ainsi pu être étudiés. Les effets de perturbateurs endocriniens sur la folliculogénèse commencent à être étudiés par une approche de culture organotypique (Peretz and Flaws, 2013). Le deuxième point fort de ce modèle est la comparaison inter-espèces (rat, souris, Homme) des effets d'un composé en cultivant différentes gonades de différentes espèces dans un même système (Habert et al., 2014). Cet aspect est fondamental et permet d'évaluer la pertinence des études réalisées sur un modèle animal par rapport à l'Homme. La comparaison du développement de l'ovaire à celui du

testicule permet aussi d'évaluer des spécificités et des sensibilité aux perturbateurs du développement sexe-dépendantes (Angenard et al., 2010; Guerquin et al., 2010; Le Bouffant et al., 2010; Angenard et al., 2011). Dans ces travaux de thèse, le modèle de culture organotypique nous a permis d'établir un « état des lieux » de l'activité mitotique des CG dans des ovaires fœtaux âgés de 7,2 à 11,8 sg cultivés en présence de BrdU pendant 3 à 96h et de comparer ces résultats aux mêmes expériences menées chez la souris (Résultats 2). Ce système nous a permis de tester le rôle de voies de signalisation, comme la voie de l'AR, dans l'ovaire fœtal humain et d'étudier la conservation de sa régulation par rapport aux données murines disponibles. Avant mon arrivée au Laboratoire, la présence et l'activité de la voie de l'AR dans l'ovaire fœtal humain avait été étudiées par culture *in vitro* d'ovaires fœtaux précoces (Le Bouffant et al., 2010). Nous avons pu compléter ces données en testant les voies du CYP26B1 et du FGF9 dans des ovaires fœtaux d'âges identiques (9,9 à 10,9 sg) cultivés en absence ou présence d'acteurs ou inhibiteurs spécifiques de ces voies (Résultats 2). Cependant, ce modèle d'étude des gonades présente des limites. Le temps de culture dépasse rarement 3-4 jours pour le testicule fœtal humain en milieu simple sans sérum. Ce temps est plus long pour les ovaires fœtaux humains que nous avons réussi à cultiver pendant 1 mois au laboratoire en présence de SVF, dont la composition exacte en facteurs de croissance est inconnue. La culture organotypique permet d'étudier l'initiation de la méiose mais n'offre pas la possibilité d'étudier la différenciation des CG sur une longue période et l'obtention de CG à des stades tardifs de la prophase I de méiose (diplotène) est difficile. De plus, Nous n'avons pas la certitude que même si les CG initient bien la méiose à un âge identique à celui observé physiologiquement, les CG parcourent correctement la prophase I. Enfin, l'inhibition de l'expression de gènes d'intérêt par une stratégie d'ARN interférence, possible sur des cultures de lignée cellulaire, n'est pas réalisable sur des cultures d'organes entiers. Du fait de l'architecture du tissu et la demi-vie très courte des siRNA, la pénétration des siRNA du milieu de culture jusque dans les cellules d'intérêt (CG par exemple) est difficile. Il faut pour appliquer cette stratégie, dissocier l'organe, trier les cellules d'intérêt, les traiter par ARNi, les ré-associer avec les cellules somatiques et remettre l'organe reconstitué en culture (Feng et al., 2014).

Nous avons donc développé un modèle de xénogreffe d'ovaires fœtaux humains au Laboratoire pour répondre à d'autres problématiques non accessibles par le modèle de culture organotypique. En effet, la majorité des prélèvements humains sont obtenus entre 7 et 10 sg. Une culture *in vitro* de 15 jours permet d'atteindre des âges équivalents à 9-12 sg. Or, même

si les premières CG entrent en méiose autour de 10 sg, la majorité des CG initient la prophase de première division de méiose autour de 14-15 sg. Peu de matériel est disponible à ces âges (IMG précoces) et la culture organotypique ne nous permet pas d'atteindre ces stades de développement de manière optimale. La xénogreffe d'ovaires fœtaux semblait une bonne solution pour disposer de matériel d'étude au bon stade de développement et *a priori* non pathologique (contrairement aux IMG). Il fallait préalablement caractériser ce modèle pour vérifier qu'il permettait un développement et une différenciation « normale » des CG. La xénogreffe d'ovaires fœtaux est décrite depuis les années 70 (Skakkebaek et al., 1974) et utilisée pour l'étude de la folliculogénèse humaine et l'optimisation des techniques de congélation de cortex ovarien (Abir et al., 2000; Oktem and Oktay, 2007; Abir et al., 2009; Wu et al., 2010). Cependant, aucune étude ne rapportait la xénogreffe d'ovaires fœtaux humains précoces et le modèle devait donc être caractérisé. Nous avons mis au point cet outil au Laboratoire au tout début de ces travaux de thèse. Dans un premier temps, la mise en œuvre technique a été optimisée. Il nous a fallu choisir, le type de souris receveuse (Nude ou Nod-scid) et son conditionnement (castration ou non), le site de greffe (sous-cutané, capsule rénale ou muscle dorsal), et la taille des fragments ovariens greffés. Le choix de la souris hôte s'est porté sur la souris Nude après comparaison avec la souris Nod-scid. En effet, la souris Nod-scid présente l'avantage d'un déficit immunitaire plus profond mais les résultats des greffes étant comparables, nous avons choisi d'utiliser la souris Nude, chez qui l'absence de poils et les conditions d'élevage facilitaient la manipulation. La taille des fragments et le site de greffe ont également été optimisés. De gros fragments voire une gonade fœtale entière facilitaient la procédure de la technique mais une probable hypoxie le temps de la néovascularisation entrainait la survenue de nécrose au sein de l'organe et une altération de son développement. Au contraire, de trop petits morceaux favorisait leur dispersion au moment de la greffe et diminuait le taux de récupération des greffons. Nous avons donc choisi une taille intermédiaire (chaque gonade est coupée en quatre morceaux jusque 9 sg et en 6 à 8 au-delà). Nous avons réalisé dans un premier temps des greffes en sous-cutané en réalisant une petite incision dans la peau du cou. Les morceaux de gonades étaient glissés sous la peau par cette effraction, puis l'incision refermée. Ce site de greffe déjà décrit (Weissman et al., 1999) permettait un développement correct des organes mais le taux de récupération des greffons était peu satisfaisant du fait d'une fréquente localisation des greffons dans la cicatrice de greffe. Nous avons ensuite testé la greffe en muscle dorsal décrite pour la greffe d'ovaires murins ou de cortex ovarien humain adulte (Soleimani et al., 2008; Soleimani et al., 2010). Cette technique nous satisfaisant pleinement en termes d'accès du site de greffe, taux

de récupération des greffons et développement des ovaires. Nous avons décidé de l'utiliser à la place de la greffe en capsule rénale, plus largement utilisée (pour comparaison avec la greffe en sous-cutané : Yang et al., 2006) mais beaucoup plus invasive pour la souris hôte. Enfin, nous avons choisi d'utiliser des souris femelles mais non ovariectomisées. Toutes les études de xenogreffe d'ovaires utilisent des souris castrées pour éviter que les variations cycliques des taux d'oestrogènes et de progestérone de la souris hôte ne perturbent le développement du greffon. Cependant, le fœtus est physiologiquement soumis pendant la gestation à un environnement riche en stéroïdes et une souris ovariectomisée va sécreter en continu de hauts taux de LH et FSH pouvant également interférer avec le développement de l'organe. Nous avons observé que le développement des greffons chez la souris ovariectomisée ou non se superposait à celui d'ovaires natifs non greffés d'âges équivalents. En revanche, le developpement d'ovaires murins greffés chez la souris non castrée était affecté (pseudo-inversion sexuelle). Les premières greffes ayant été réalisées avec des ovaires murins, les équipes ont peut-être gardé l'habitude d'ovariectomiser les souris receveuses même si, de notre expérience, l'ovaire humain ne semble pas sensible aux hormones murines. Une fois le protocole de greffe mis au point, nous avons caractérisé la différenciation des CG pendant la greffe. En comparant ces données à celles obtenues grâce à des ovaires d'âges équivalents non greffés, il a été mis en évidence que la xénogreffe d'ovaires fœtaux humains précoces dans le muscle dorsal de souris immunodéficientes Nude mimait le développement physiologique de la lignée germinale en termes de densité de cellules germinales, de proportion de cellules germinales entrées en méiose et parcourant les différents stades de la prophase I (Résultats 1). Le développement de l'ovaire n'était ni plus lent ni plus rapide et nous avons pu observer une cinétique de disparition des marqueurs de pluripotence et apparition des marqueurs de la lignée germinale identique à celle observée dans des ovaires non greffés. Les stratégies d'ARNi sont utilisées en xenogreffe de cellules humaines, comme l'injection sous-cutané de cellules humaines cancéreuses (Delloye-Bourgeois et al., 2009; Koyanagi et al., 2013). Nous avons adapté ces protocoles à l'organe humain greffé et avons pu inhiber spécifiquement un gène cible dont nous suspections un rôle dans la transition mitose/méiose : le gène *DMRTA2*. Les greffons étant rapidement vascularisés et en connexion avec le système vasculaire de la souris hôte (Nisolle et al., 2000), la xénogreffe nous a permis la dégradation d'ARNm ciblés dans l'organe greffé par l'injection intra péritonéale de siRNA chez la souris. Grâce à l'utilisation de siRNA très spécifiques de la séquence génique humaine, nous avons ainsi pu inhiber l'expression de *DMRTA2* humain sans interférer avec les autres membres de la famille des *DMRT* ni inhiber le gène d'intérêt murin (Résultats 1).

Cet outil nous offre de nouvelles perspectives. Cependant, il comporte également certaines limites. En effet, lorsque des ovaires de moins de 8 sg étaient greffés, le taux de récupération des greffons était moins satisfaisant que celui proche de 100% obtenu avec la greffe d'ovaires d'âge estimé à plus de 8,5 sg. Ce phénomène serait à étudier pour savoir s'il ne relève que d'un problème expérimental ou si l'ovaire doit avoir atteint un stade de différenciation, qui serait à établir, pour se développer correctement après greffe. Enfin, notre stratégie d'ARNi sur les ovaires greffés s'est révélée moins fructueuse avec deux autres gènes : *DMRTB1* et *DMRTC2*. Le même protocole d'injections intra-péritonéales de siRNA dirigés spécifiquement contre les séquences humaines d'un de ces deux gènes n'a pas permis de mettre en évidence par RT-qPCR l'inhibition de l'expression de ces gènes qui était parfois même augmentée par rapport au contrôle. Pourtant, les greffons traités présentaient, après analyses histologiques préliminaires, un phénotype de ralentissement de la différenciation de CG similaire à celui observé avec l'inhibition de *DMRTA2*. Nous avons pensé que les siRNA avaient probablement correctement inhibé l'expression du gène mais qu'un turn-over trop rapide ou un niveau d'expression trop élevé de ces deux *DMRT* nous avait empêché de mettre en évidence cette inhibition. Il est possible que l'inhibition fût ponctuelle après chaque injection mais suffisante pour induire un phénotype ou qu'au contraire, les effets observés résultaient de la surexpression du gène en réponse aux siRNA. L'injection de plus fortes doses de siRNA (1mg/kg/j) ayant entraîné des réactions sévères chez certaines souris, il ne nous a pas semblé envisageable d'essayer de nouveau cette posologie pour les nouveaux gènes d'intérêt testés. Cette stratégie necessite d'être optimisée. Le modèle de xénogreffe pourrait être couplé à une autre technique d'inhibition de l'expression de gènes plus adaptée à l'expression des autres *DMRT* pour optimiser le modèle.

Ces différentes approches expérimentales, en comparaison avec les données murines, nous ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la transition mitose/méiose chez l'Homme, d'un possible échappement de certaines ovogonies à ce processus et d'appréhender les mécanismes de perturbation de cette période de développement de la lignée germinale. Cependant, ces mécanismes doivent être clarifiés et les modèles d'études utilisés nous limitent dans certaines investigations.

2. Différenciation de la lignée germinale, apport de nos résultats

Chez la souris, il est proposé que les CG doivent acquérir une compétence intrinsèque permettant la transition mitose/méiose. Le facteur *DAZL* a été proposé et demeure actuellement le seul gène dont le rôle pour cette fonction a été rapportée. Les CG des souris invalidées pour *Dazl* n'entrerons pas en méiose quelles que soient les voies activatrices surexprimées (Lin et al., 2008; Gill et al., 2011). Ce facteur représente en quelque sorte le « gardien » de la différenciation germinale qui autorise l'accès aux étapes pré-méiotiques. Par notre modèle de xénogreffe couplé à une stratégie d'ARNi, nous avons pu suspecter le rôle d'un gène non décrit jusque là dans l'ovaire humain : *DMRTA2*, comme acteur de la différenciation des CG en amont de *DAZL*. En effet, suite à l'inhibition spécifique de l'expression de ce gène dans des ovaires fœtaux greffés, nous avons pu mettre en évidence un ralentissement de l'entrée en différenciation des CG ovariennes (Résultats 1). La densité des CG était conservée et nous n'avons pas mis en évidence d'altération de la prolifération (BrdU, Ki67) ou de l'apoptose (Capsase-3 clivée, TUNEL) dans les ovaires traités (mix de 3 siRNA dirigés contre la séquence humaine de *DMRTA2*) par rapport aux ovaires contrôles (siRNA contrôle universel). En revanche, la proportion d'ovogonies était significativement augmentée dans les ovaires traités, démontrée par une proportion plus importante de cellules positives pour le marqueur de CG indifférenciées SSEA1, une diminution des cellules positives pour le marqueur méiotique γH2AX ainsi qu'une diminution du nombre de cellules à des stades de prophase I de méiose. L'analyse par RT-qPCR de greffes traitées et contrôles a permis de mettre en évidence une diminution significative de l'expression du marqueur de différenciation des CG, *DDX4*, et des marqueurs méiotiques, *STRA8* et *SPO11*. L'expression de *DAZL* était également diminuée nous laissant suspecter un rôle de *DMRTA2* en amont de *DAZL* et un potentiel rôle dans l'acquisition de la compétence des CG à entrer en différenciation. *DMRTA2* ne peut cependant pas être le régulateur universel de *DAZL* qui est aussi exprimé dans le testicule fœtal alors que l'expression de *DMRTA2* n'y est pas retrouvée. Il existe donc un autre inducteur de DAZL. Il serait intéressant d'étudier les autres membres des DMRT dans ce potentiel rôle. De plus, l'expression de *DMRTB1* et *DMRTC2* était également diminuée en réponse à l'inhibition de *DMRTA2* alors que nous avions vérifié que les séquences de ces deux gènes n'étaient pas reconnues par les siRNA utilisés. Il serait intéressant d'étudier plus amplement la régulation des différents *DMRT* dans les gonades fœtales humaines et notamment leur potentielle co-régulation. *Dmrt1* et *Dmrt7*/*Dmrtc2* ont été plus largement décrits pour leur implication dans la différenciation des CG chez la souris.

Etudier leur rôle et celui des autres membres de la famille des *DMRT* chez l'humain serait particulièrement intéressant pour comprendre leur rôle chez l'Homme. La différenciation lente des CG humaines par rapport au modèle murin semble faciliter la mise en evidence de la hiérarchisation des différents facteurs. Chez la souris, la réponse à cette question semble diificile à préciser car *Dmrta2*, *Dmrtb1* et *Dmrtc2* « s'allument » au même moment au cours du développement. Nos travaux ont permis de confirmer ou montrer l'expression des différents DMRT dans les gonades humaines mais la question du contrôle de la régulation de ces gènes reste cependant ouverte.

Les facteurs contrôlant l'entrée en méiose ont été largement étudiés chez la souris. Certaines hypothèses avancées ne reposent pas sur des preuves formelles et le scénario exact n'a pas encore été établi. Cependant, il est admis que deux facteurs régulent principalement la transition mitose/méiose : l'AR et le FGF9 (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006; Barrios et al., 2010; Bowles et al., 2010). Il est proposé que les ALDH du mésonéphros synthétisent l'AR (Bowles et al., 2006). Ce facteur diffusible va induire l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose des CG dans l'ovaire fœtal. Dans le testicule fœtal, CYP26B1 va dégrader l'AR produit (MacLean et al., 2007) et l'expression de *Stra8* ne sera plus stimulée. Parallèlement, FGF9 va induire l'expression de *Nanos2* qui va réprimer l'entrée en méiose et induire le programme mâle (Suzuki and Saga, 2008; Barrios et al., 2010). Chez l'Homme, des travaux antérieurs de l'équipe avaient mis en évidence que la production d'AR intrinsèque était possible dans l'ovaire et l'ALDH1A1 était suspectée pour ce rôle (Le Bouffant et al., 2010). Dans ce manuscrit, nous confirmons la forte expression d'ALDH1A1 dans les CG et les cellules somatiques des nids ovigères dans des ovaires fœtaux de 11 à 27 sg (Résultats 2). Il avait également été montré, précédemment, que la voie de l'AR était active dans l'ovaire fœtal humain puisque l'AR exogène stimulait l'expression de gènes cibles de l'AR : *CYP26A1* et *RARβ2* (Le Bouffant et al., 2010). En cultivant des ovaires fœtaux de 1er trimestre de gestation (contenant peu de CG méiotiques), nous avons confirmé ces résultats et montré que l'ajout d'un inhibiteur spécifique de CYP26B1 entrainait la surexpression de ces deux gènes cibles (Résultats 2). Ces résultats montrent une synthèse d'AR fonctionnel dans les ovaires humains et la présence de CYP26B1 actif. De même, la voie de signalisation du FGF9 semble en place dans l'ovaire fœtal. Il est possible de penser que ces voies se régulent localement ou différemment chez l'Homme. L'AR pourrait par exemple être proposé pour inhiber la voie de signalisation du FGF9.

Il est établi chez le mammifère que la transition mitose/méiose des CG a lieu à des stades précoces du développement embryonnaire chez la femelle ou en période post-natale chez le mâle. Ce dogme a été établi à partir d'études principalement menées chez le rongeur, et plus particulièrement chez la souris (Byskov, 1986). Chez la souris femelle, toutes les cellules entrent en méiose en 2 jours seulement, juste après avoir colonisé la gonade fœtale (Trautmann et al., 2008). Cependant, la présence de cellules présentant des marqueurs de cellules indifférenciés tels que OCT4, NANOG ou SSEA1 a été décrite dans des ovaires humains tardifs (Stoop et al., 2005; Anderson et al., 2007; Kerr et al., 2008b). Par nos travaux, nous avons pu confirmer la présence de CG mitotiques ou « quiescentes » dans des ovaires fœtaux humains tardifs. L'expression de gènes associés aux CGP et aux ovogonies comme *NANOG, D240* et *NANOS3* était retrouvée au-delà de 20 sg, sans diminution notable du niveau d'expression. Des analyses *in situ* ont permis de confirmer la présence d'ovogonies (SSEA1+/D240+/AP2γ+) localisées dans le cortex externe d'ovaires étudiés jusque 35 sg. L'analyse d'ovaires du 1er trimestre a montré que toutes les cellules n'étaient pas positives pour le marqueur de prolifération Ki67 (marqueurs de toutes les phases du cycle cellulaire excepté la phase G0) et que même après 96h d'exposition au BrdU, environ 20% des ovogonies n'avaient pas répliqué leur ADN. La même expérience chez la souris a révélé que dans des ovaires de 12,5 jpc cultivés en présence de BrdU, 100% des CG avaient répliqué leur ADN au bout de 24h. Ce résultat suggère un *timing* de prolifération et/ou de différenciation des ovogonies différent entre la souris et l'Homme et que chez la femme, une sous-population de CG pourrait être capable d'arrêter son cycle cellulaire. La présence de ces cellules doit être caractérisée et le fait que ce soit une originalité humaine ou la conséquence d'un processus commun à diverses espèces doit être élucidé. Dans tous les cas, la présence de ces cellules chez la femme est une autre grande différence entre le développement ovarien murin et humain et questionne sur la conservation des mécanismes en jeu.

La co-existence d'ovogonies à des stades variés de différenciation, parfois au sein d'un même nid ovigère, nous a interpellé. En effet, comment un signal diffusible (cas de l'AR) pourrait induire l'entrée en méiose pour certaines CG alors que d'autres, dans un environnement proche, persistent à l'état indifférencié ? Il est envisageable que certaines CG ne soient pas compétentes pour répondre aux signaux pro-méiotiques et initier la prophase I. Dans ce cas, ces cellules persistantes ne s'étant pas différenciées correctement ou selon un bon *timing* devraient être, à terme, éliminées de l'organe. Cependant, l'observation d'ovogonies jusqu'à des stades tardifs du développement ovarien suggère plutôt un développement asynchrone de

l'acquisition des marqueurs de différenciation dans l'ovaire humain et une capacité de réponse à des signaux locaux activateurs ou inhibiteurs de la méiose étalée dans le temps. Il serait intéressant d'isoler les différentes populations de CG dans l'ovaire pour les caractériser et évaluer leur état de différenciation et leur compétence. Une étude d'Anderson et col. a montré trois profils d'expression des marqueurs DAZL et VASA dans les CG non méiotiques : de rares cellules uniquement DAZL+, des cellules DAZL+/VASA+ et majoritairement des cellules VASA+/DAZL-. Pour explorer l'hypothèse d'une régulation particulière des facteurs pro- et anti-méiotiques dans l'ovaire, nous avons étudié le profil d'expression de marqueurs connus chez la souris pour prévenir l'initiation de la méiose dans le testicule et soutenir le programme mâle : *CYP26B1* et *NANOS2*. Leur expression avait déjà été rapportée dans l'ovaire humain (Le Bouffant et al., 2010; Childs et al., 2011). Par ces travaux, nous confirmons leur expression à des niveaux plus élevés dans l'ovaire fœtal que dans le testicule et nous rapportons également l'expression de FGF9. Nous rapportons également la présence protéique de CYP26B1 et FGF9 dans des ovaires jusqu'à des stades tardifs du développement. Par des cultures organotypiques, nous avons démontré que ces deux voies sont actives dans l'ovaire fœtal et pourraient promouvoir localement un destin germinal considéré jusque là comme mâle. Ces travaux montrent donc l'existence de mécanismes de prévention de la transition mitose/méiose dans le testicule fœtal mais aussi dans l'ovaire fœtal humain. L'existence de ces mécanismes pourrait expliquer la persistance d'ovogonies observées dans l'ovaire fœtal. D'autres facteurs activateurs de méiose décrits très récemment (après nos travaux ce qui explique que nous ne les ayons pas étudiés) chez la souris pourraient avoir un rôle plus important dans la régulation de la transition mitose/méiose chez l'Homme. C'est le cas de la voie NOTCH, dont le rôle pro-méiotique vient d'être publié chez la souris (Feng et al., 2014). Ce facteur est connu pour agir en gradient de concentration en fonction de la proximité de la cellule avec la source productrice du signal. Ce phénomène pourrait expliquer que deux CG ne reçoivent pas les mêmes signaux activateurs. La localisation des ovogonies « souches » dans l'ovaire reste énigmatique. Il a été proposé que ces cellules se concentrent dans le cortex externe, juste sous l'épithélium mais la caractérisation précise de cette localisation reste à établir pour mieux interpréter et comprendre ces phenomènes. Une régulation plus fine et plus complexe qu'un système simple activation/répression répression observé chez la souris pourrait être en place chez l'Homme.

Par une approche toxicologique *in vitro*, nous avons étudié l'impact d'une substance thérapeutique sur la lignée germinale ovarienne en développement. Ce travail a permis de

mettre en évidence la présence du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'ovaire fœtal et sa voie de signalisation active dans la gonade. Le gène *PLZF* étant une cible directe de l'activation du récepteur NR3C1, nous avons mis en évidence son expression dans l'ovaire fœtal. *Plzf* a été décrit comme le gardien de l'état souche des CG mâle chez la souris et est utilisé comme marqueur des précurseurs germinaux testiculaires (Costoya et al., 2004). Dans le testicule adulte, *Plzf* réprime l'expression du gène de survie *Kit*. Il était intéressant de trouver ce facteur mâle dans des ovaires fœtaux du 1er trimestre de gestation. Par ces travaux, nous avons en effet mis en évidence que la dexaméthasone induisait dans l'ovaire humain l'expression de *PLZF* et réprimait l'expression de *KIT*. La diminution significative du nombre de CG et l'augmentation du nombre de cellules en apoptose observées après traitement des ovaires par la dexaméthasone pourrait s'expliquer par la diminution de l'expression de *KIT* suite à l'augmentation de *PLZF* en réponse à la stimulation du récepteur aux glucocorticoïdes. De plus, nous avons montré que la stimulation de l'expression de *PLZF* était potentialisée en présence de progestérone. Sachant que le fœtus est exposé à de fortes concentrations de progestérone pendant la grossesse, l'effet délétère de la dexaméthasone observé sur la lignée germinale était d'autant plus inquiétant. Ces données nécessitent d'être confirmées par des études épidémiologiques chez des femmes exposées *in utero*. D'un point de vue fondamental, la découverte de l'existence d'une voie PLZF/KIT fonctionnelle dans l'ovaire est originale et soulève la question d'un rôle de KIT dans l'entrée en méiose, comme cela a été proposé dans le testicule post-natal (Filipponi et al., 2007).

3. Conséquences de ces résultats et perspectives

Les résultats présentés dans ce manuscrit nous ont permis d'éclaircir certains points du développement de la lignée germinale chez la femme et mettre en évidence d'importantes différences entre le développement ovarien chez la femme et celui décrit chez la souris mais de nombreuses questions restent en suspens et devront faire l'objet de recherches futures. L'utilisation de nouveaux outils d'étude nous a permis d'appréhender certaines questions et de prouver que les études chez l'homme étaient réalisables. Ils présentent cependant certaines limites et peuvent être optimisés pour des recherches futures. Parmi les étapes clés qui méritent un effort de recherche, nous ciblons i) l'entrée en méiose des ovogonies ii) la persistance de cellules souches dans l'ovaire humain et iii) l'expression dans l'ovaire de

marqueurs décrits comme « mâles ». Il est en effet nécessaire de mieux définir les CG mâles et femelles chez l'Homme, de confirmer/infirmer les mécanismes de différenciation de la lignée germinale décrits chez la souris voire de révéler de nouveaux mécanismes spécifiques du développement humain. Les causes d'infertilité restent souvent inexpliquées. Améliorer nos connaissances fondamentales dans le domaine nous permettra de répondre plus précisément aux questions des patients concernant leurs difficultés à procréer, voire, à plus long terme, prévenir de certaines infertilités ou restaurer en partie une fertilité naturelle.

La caractérisation des différentes populations de cellules germinales dans l'ovaire pourrait être plus poussée si l'on pouvait les isoler les unes des autres et les analyser par des techniques de biologie moléculaire comme la RT-qPCR ou même par séquençage ARN (RNAseq). La première difficulté est d'obtenir du tissu humain le plus viable possible pour que les cellules germinales, fragiles, résistent à la dissociation du tissu puis au tri cellulaire par MACS ou FACS. Le tri de cellules viables est nécessaire pour leur mise en culture après isolement ou leur analyse par PCR. Les tissus des rares IMG auxquelles nous avons eu accès n'étaient pas suffisamment viables pour supporter une dissociation, un marquage cellulaire et un tri cellulaire. La deuxième difficulté est d'avoir un marqueur membranaire spécifique des CG et du stade de différenciation cellulaire à étudier. Nous avons dans un premier temps utilisé le marqueur de cellules souches SSEA1 pour isoler les CG dans des ovaires jeunes. L'expression de SSEA1 est maximum à 8 sg puis diminue fortement entre 11 et 13 sg (Stoop et al., 2005). La plupart des CG avant 12 sg sont positives pour SSEA1. Ce marqueur n'est cependant pas exclusivement exprimé par les CG. Certaines cellules somatiques l'expriment et le tri par ce marqueur compromet la pureté de la fraction de CG isolée. L'expression de *DDX4/VASA* débute vers 8 sg et augmente fortement jusque 15 sg où elle atteint un maximum et se maintien à haut niveau ensuite. Ce marqueur serait idéal car spécifique des CG mais il est malheureusement cytoplasmique. Même si il a été rapporté l'isolement de CG humaines par l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la partie C-terminale de la proteine VASA, apparemment retrouvée à la surface des CG, la pertinence de ce marquage fait débat (White et al., 2012).

Pour s'affranchir d'une altération de la viabilité des tissus humains obtenus à des stades tardifs, nous projetons de greffer les ovaires précoces pendant plusieurs semaines. Une fois le greffon récupéré à l'âge d'étude voulu, il sera dissocié et les cellules germinales triées pour mise en culture et/ou analyse. La greffe nous a également permis d'inhiber l'expression de *DMRTA2* mais ce modèle de xénogreffe couplé à de l'ARN interférence ne s'est pas montré

suffisamment robuste lorsque l'expression du gène cible était plus forte ou présentant un *turn-over* plus rapide. Pour palier ce problème, il serait possible d'injecter des oligonucléotides morpholinos modifiant la traduction des ARNm cibles en protéine. Les oligonucléotides morpholinos sont plus stables que les autres ARN antisens. Les quantités nécessaires pour atteindre l'organe cible sont donc donc à priori plus faibles et la fréquence d'administration diminuée ce qui limite les risques de réaction immunitaire. Les morpholinos ne provoquent pas d'effets non désirés hors-cible de type *off-target* (Summerton, 2007). Les morpholinos sont très utilisés dans de nombreux modèles comme le zebrafish pour inhiber ou au contraire forcer l'expression d'une proteine cible. Leur utilisation thérapeutique constitue une importante voie de recherche clinique. Chez la souris modèle de la myoptahie de Duchenne (souris mdx), il a été montré l'efficacité de ces oligonucléotides pour restaurer la fonction de la dystrophine après injection par voie intra-veineuse (Alter et al., 2006). Des essais thérapeutiques chez l'Homme sont en cours. Il serait envisageable de modifer notre modèle de xénogreffe couplé à une stratégie d'ARN-interférence en injectant des morpholinos et non des siRNA.

Enfin, le modèle de xénogreffe permet l'étude toxicologique d'un certain nombre de substances potentiellement reprotoxiques. La présence de nombreux xénobiotiques dans l'environnement pourrait avoir un effet délétère sur les fonctions de Reproduction. Les études épidémiologiques sont difficiles car longues et nécessitent un nombre d'individus suffisant pour s'affranchir des facteurs confondants. Ces études sont indispensables et souvant réalisée pour confirmer chez l'Homme les données obtenues *in vitro* ou chez le rongeur. L'utilisation du modèle de xénogreffe peut permettra d'étudier l'impact *in vivo* de xénobiotiques à différentes concentrations, seuls ou en association, sur le développement des gonades fœtales humaines. Grâce à ce modèle, il sera possible de mimer une exposition fœtale de la gonade à différents toxiques et d'étudier les voies de signalisation mises en jeu. Par exemple, nos résultats obtenus sur l'impact de la dexaméthasone sur les CG dans l'ovaire fœtal humain pourraient être approfondies en exposant les souris greffées à des doses de dexaméthasone identiques à celles administrées chez la femme enceinte et étudier l'impact sur les greffons.

BIBLIOGRAPHIE

Abir, R., Orvieto, R., Raanani, H., Fisch, B., Schoenfeld, A., Ginton, D., Nitke, S., and Ben Rafael, Z. (2000). Development of human fetal follicles in an immunodeficient mouse. J Assist Reprod Genet 17, 393-396.

Abir, R., Orvieto, R., Raanani, H., Feldberg, D., Nitke, S., and Fisch, B. (2003). Parameters affecting successful transplantation of frozen-thawed human fetal ovaries into immunodeficient mice. Fertil Steril 80, 421-428.

Abir, R., Biron-Shental, T., Orvieto, R., Garor, R., Krissi, H., and Fisch, B. (2009). Transplantation of frozen-thawed late-gestational-age human fetal ovaries into immunodeficient mice. Fertil Steril 92, 770-777.

Adams, I. R., and McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. Development 129, 1155-1164.

Aho, M. O., Koivisto, A. M., Tammela, T. L., and Auvinen, A. P. (2003). Geographical differences in the prevalence of hypospadias in Finland. Environ Res 92, 118-123.

Almind, G. J., Brondum-Nielsen, K., Bangsgaard, R., Baekgaard, P., and Gronskov, K. (2009). 11p Microdeletion including WT1 but not PAX6, presenting with cataract, mental retardation, genital abnormalities and seizures: a case report. Mol Cytogenet 2, 6.

Alter, J., Lou, F., Rabinowitz, A., Yin, H., Rosenfeld, J., Wilton, S. D., Partridge, T. A., and Lu, Q. L. (2006). Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. Nat Med 12, 175-177.

Amorim, C. A., David, A., Dolmans, M. M., Camboni, A., Donnez, J., and Van Langendonckt, A. (2011). Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. J Assist Reprod Genet 28, 1157-1165.

Amorim, C. A., Dolmans, M. M., David, A., Jaeger, J., Vanacker, J., Camboni, A., Donnez, J., and Van Langendonckt, A. (2012). Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. Fertil Steril 98, 1291-8.e1.

Ancelin, K., Lange, U. C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A. J., Kouzarides, T., and Surani, M. A. (2006). Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. Nat Cell Biol 8, 623-630.

Anderson, E. L., Baltus, A. E., Roepers-Gajadien, H. L., Hassold, T. J., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M., and Page, D. C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 14976-14980.

Anderson, R. A., Fulton, N., Cowan, G., Coutts, S., and Saunders, P. T. (2007). Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. BMC Dev Biol 7, 136.

Anderson, R. A., McIlwain, L., Coutts, S., Kinnell, H. L., Fowler, P. A., Childs, A. J. (2014). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by a component of cigarette smoke reduces germ cell proliferation in the human fetal ovary. Mol Hum Reprod 20, 42-8.

Angenard, G., Muczynski, V., Coffigny, H., Pairault, C., Duquenne, C., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., and Livera, G. (2010). Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis. Environ Health Perspect 118, 331-337.

Angenard, G., Muczynski, V., Coffigny, H., Duquenne, C., Frydman, R., Habert, R., Livera, G., and Rouiller-Fabre, V. (2011). In vitro effects of Uranium on human fetal germ cells. Reprod Toxicol 31, 470-476.

Archambeault, D. R., and Yao, H. H. (2010). Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 10526-10531.

Aubard, Y. (2003). Ovarian tissue xenografting. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 108, 14-18.

Auguste, A., Chassot, A. A., Gregoire, E. P., Renault, L., Pannetier, M., Treier, M., Pailhoux, E., and Chaboissier, M. C. (2011). Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. Sex Dev 5, 304-317.

Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y. C., Goodheart, M. L., Carpenter, A. E., de Rooij, D. G., and Page, D. C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. Nat Genet 38, 1430-1434.

Bannister, L. A., Reinholdt, L. G., Munroe, R. J., and Schimenti, J. C. (2004). Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allelle of the meiotic cohesin Rec8. Genesis 40, 184-194.

Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kist, R., Taketo, M. M., Englert, C., and Scherer, G. (2006). Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. Biol Reprod 74, 195-201.

Barrios, F., Filipponi, D., Pellegrini, M., Paronetto, M. P., Di Siena, S., Geremia, R., Rossi, P., De Felici, M., Jannini, E. A., and Dolci, S. (2010). Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. J Cell Sci 123, 871-880.

Baudat, F., Imai, Y., and de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. Nat Rev Genet 14, 794-806.

Baudat, F., Manova, K., Yuen, J. P., Jasin, M., and Keeney, S. (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. Mol Cell 6, 989-998.

Baxter, R. M., and Vilain, E. (2013). Translational genetics for diagnosis of human disorders of sex development. Annu Rev Genomics Hum Genet 14, 371-392.

Behringer, R. R., Cate, R. L., Froelick, G. J., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1990). Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. Nature 345, 167-170.

Bendsen, E., Laursen, S., Olesen, C., Westergaard, L., Andersen, C., and Byskov, A. (2001). Effect of 4-octylphenol on germ cell number in cultured human fetal gonads. Hum Reprod 16, 236-243.

Best, D., Sahlender, D. A., Walther, N., Peden, A. A., and Adams, I. R. (2008). Sdmg1 is a conserved transmembrane protein associated with germ cell sex determination and germline-soma interactions in mice. Development 135, 1415-1425.

Beumer, T. L., Kiyokawa, H., Roepers-Gajadien, H. L., van den Bos, L. A., Lock, T. M., Gademan, I. S., Rutgers, D. H., Koff, A., and de Rooij, D. G. (1999). Regulatory role of p27kip1 in the mouse and human testis. Endocrinology 140, 1834-1840.

Bezard, J., and Mauleon, P. (1984). Ultrastructural changes in female germ cells during the meiotic prophase in the rat: a special study of membranes after cryofracture. Reprod Nutr Dev 24, 865-886.

Biason-Lauber, A. (2010). Control of sex development. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 24, 163-186.

Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J. A., Parker, K. L., Porter, F. D., and Westphal, H. (2000). The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. Nature 403, 909-913.

Blandau, R., Warrick, E., and Rumery, R. E. (1965). In vitro cultivation of fetal mouse ovaries. Fertil Steril 16, 705-715.

Blomhoff, R. (1994). Transport and metabolism of vitamin A. Nutr Rev 52, S13-S23.

Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D. G., and Cooke, H. J. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. J Cell Biol 176, 741-747.

Bonilla-Musoles, F., Renau, J., Hernandez-Yago, J., and Torres, y. J. (1975). How do oocytes disappear? Archives of Gynecology and Obstetrics 218, 233-241.

Born, G. (1897). über Verwachsungsversuche mit Amphibienlarven. Development Genes and Evolution 4, 517-623.

Bosma, G. C., Custer, R. P., and Bosma, M. J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature 301, 527-530.

Bouillet, P., Oulad-Abdelghani, M., Vicaire, S., Garnier, J. M., Schuhbaur, B., Dolle, P., and Chambon, P. (1995). Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, Stra1 (mouse LERK-2/Eplg2). Dev Biol 170, 420-433.

Boulanger, L., Pannetier, M., Gall, L., Allais-Bonnet, A., Elzaiat, M., Le Bourhis, D., Daniel, N., Richard, C., Cotinot, C., Ghyselinck, N. B., and Pailhoux, E. (2014). FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. Curr Biol 24, 404-408.

Bourc'his, D., and Bestor, T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. Nature 431, 96-99.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., and Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science 312, 596-600.

Bowles, J., Feng, C. W., Spiller, C., Davidson, T. L., Jackson, A., and Koopman, P. (2010). FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. Dev Cell 19, 440-449.

Bowles, J., and Koopman, P. (2013). Precious cargo: regulation of sex-specific germ cell development in mice. Sex Dev 7, 46-60.

Britt, K. L., and Findlay, J. K. (2003). Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. Mol Cell Endocrinol 202, 11-17.

Brouwers, M. M., Feitz, W. F., Roelofs, L. A., Kiemeney, L. A., de Gier, R. P., and Roeleveld, N. (2006). Hypospadias: a transgenerational effect of diethylstilbestrol? Hum Reprod 21, 666-669.

Brunelli, S., Faiella, A., Capra, V., Nigro, V., Simeone, A., Cama, A., and Boncinelli, E. (1996). Germline mutations in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. Nat Genet 12, 94-96.

Bucay, N., Yebra, M., Cirulli, V., Afrikanova, I., Kaido, T., Hayek, A., and Montgomery, A. M. (2009). A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and sertoli cells from human embryonic stem cells. Stem Cells 27, 68-77.

Byskov, A. G., and Saxen, L. (1976). Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro. Dev Biol 52, 193-200.

Byskov, A. G. (1982). Primordial germ cells and regulation of meiosis. Reproduction in mammals 1, 1-16.

Byskov, A. G. (1986). Differentiation of mammalian embryonic gonad. Physiol Rev 66, 71-117.

Carabatsos, M. J., Elvin, J., Matzuk, M. M., and Albertini, D. F. (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. Dev Biol 204, 373-384.

Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates, J. R., Hays, L., Morgan, W. F., and Petrini, J. H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. Cell 93, 477-486.

Carrel, A., and Burrows, M. T. (1910). Culture de tissus adultes en dehors de l'organisme. CR Soc Biol (Paris) 69, 293-294.

Carrel, A., and Burrows, M. T. (1911). Cultivation of tissues in vitro and its technique. The Journal of experimental medicine 13, 387-396.

Carrel, A. (1923). A method for the physiological study of tissues in vitro. The Journal of experimental medicine 38, 407-418.

Carson, R. (1962). Silent Spring, Houghton Mifflin eds, Boston.

Castrillon, D. H., Quade, B. J., Wang, T. Y., Quigley, C., and Crum, C. P. (2000). The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 9585-9590.

Cau, M., Addis, M., Congiu, R., Meloni, C., Cao, A., Santaniello, S., Loi, M., Emma, F., Zuffardi, O., Ciccone, R., Sole, G., and Melis, M. A. (2006). A locus for familial skewed X chromosome inactivation maps to chromosome Xq25 in a family with a female manifesting Lowe syndrome. J Hum Genet 51, 1030-1036.

Chaboissier, M. C., Kobayashi, A., Vidal, V. I., Lutzkendorf, S., van de Kant, H. J., Wegner, M., de Rooij, D. G., Behringer, R. R., and Schedl, A. (2004). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. Development 131, 1891-1901.

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. Nature 450, 1230-1234.

Chambon, P. (1994). The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. Semin Cell Biol 5, 115-125.

Chang, H., and Matzuk, M. M. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. Mech Dev 104, 61-67.

Chassot, A. A., Ranc, F., Gregoire, E. P., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., de Rooij, D. G., Schedl, A., and Chaboissier, M. C. (2008). Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. Hum Mol Genet 17, 1264-1277.

Chassot, A. A., Gregoire, E. P., Lavery, R., Taketo, M. M., de Rooij, D. G., Adams, I. R., and Chaboissier, M. C. (2011). RSPO1/beta-catenin signaling pathway regulates oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. PLoS One 6, e25641.

Childs, A. J., Kinnell, H. L., Collins, C. S., Hogg, K., Bayne, R. A., Green, S. J., McNeilly, A. S., and Anderson, R. A. (2010). BMP signaling in the human fetal ovary is developmentally regulated and promotes primordial germ cell apoptosis. Stem Cells 28, 1368-1378.

Childs, A. J., Cowan, G., Kinnell, H. L., Anderson, R. A., and Saunders, P. T. (2011). Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. PLoS One 6, e20249.

Childs, A. J., Kinnell, H. L., He, J., and Anderson, R. A. (2012). LIN28 is selectively expressed by primordial and pre-meiotic germ cells in the human fetal ovary. Stem Cells Dev 21, 2343-2349.

Chiquoine, A. D. (1954). The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. Anat Rec 118, 135-146.

Clermont, Y., and Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. Am J Anat 100, 241-267.

Clugston, R. D., Blaner, W. S. (2012). The adverse effects of alcohol on Vitamin A metabolism. Nutrients 4, 356-71.

Cook, M. S., Coveney, D., Batchvarov, I., Nadeau, J. H., and Capel, B. (2009). BAX-mediated cell death affects early germ cell loss and incidence of testicular teratomas in Dnd1(Ter/Ter) mice. Dev Biol 328, 377-383.

Cooke, J. E., Heasman, J., and Wylie, C. C. (1996). The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers. Dev Biol 174, 14-21.

Correa, S. M., Washburn, L. L., Kahlon, R. S., Musson, M. C., Bouma, G. J., Eicher, E. M., and Albrecht, K. H. (2012). Sex reversal in C57BL/6J XY mice caused by increased expression of ovarian genes and insufficient activation of the testis determining pathway. PLoS Genet 8, e1002569.

Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K. E., Wolgemuth, D. J., and Pandolfi, P. P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. Nat Genet 36, 653-659.

Culty, M. (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. Birth Defects Res C Embryo Today 87, 1-26.

Damstra, T., Page, S. W., Herrman, J. L., and Meredith, T. (2002). Persistent organic pollutants: potential health effects? J Epidemiol Community Health 56, 824-825.

De Felici, M., and Dolci, S. (1991). Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. Dev Biol 147, 281-284.

De Felici, M. (2009). Primordial germ cell biology at the beginning of the XXI century. Int J Dev Biol 53, 891-894.

De Felici, M. (2010). Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. Mol Hum Reprod 16, 632-636.

De Felici, M. (2013). Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. In Oogenesis, Springer eds, pp. 19-37.

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

de Sousa Lopes, S. M., Roelen, B. A., Monteiro, R. M., Emmens, R., Lin, H. Y., Li, E., Lawson, K. A., and Mummery, C. L. (2004). BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes Dev 18, 1838-1849.

DeFalco, T., and Capel, B. (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. Annu Rev Cell Dev Biol 25, 457-482.

Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M. M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. J Natl Cancer Inst 101, 237-247.

DiNapoli, L., Batchvarov, J., and Capel, B. (2006). FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. Development 133, 1519-1527.

DiNapoli, L., and Capel, B. (2008). SRY and the standoff in sex determination. Mol Endocrinol 22, 1-9.

Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Koprunner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C. V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. Cell 111, 647-659.

Dokshin, G. A., Baltus, A. E., Eppig, J. J., and Page, D. C. (2013). Oocyte differentiation is genetically dissociable from meiosis in mice. Nat Genet 45, 877-883.

Dolci, S., and De Felici, M. (1990). A study of meiosis in chimeric mouse fetal gonads. Development 109, 37-40.

Dolci, S., Williams, D. E., Ernst, M. K., Resnick, J. L., Brannan, C. I., Lock, L. F., Lyman, S. D., Boswell, H. S., and Donovan, P. J. (1991). Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. Nature 352, 809-811.

Dolmans, M. M., Luyckx, V., Donnez, J., Andersen, C. Y., and Greve, T. (2013). Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. Fertil Steril 99, 1514-1522.

Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., and Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature 383, 531-535.

Donnez, J., Dolmans, M. M., Pellicer, A., Diaz-Garcia, C., Sanchez Serrano, M., Schmidt, K. T., Ernst, E., Luyckx, V., and Andersen, C. Y. (2013). Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. Fertil Steril 99, 1503-1513.

Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R., and Smitz, J. (2000). Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. Rev Reprod 5, 143-152.

Dvorak, M., and Tesarik, J. (1980). Ultrastructure of human ovarian follicles. In Biology of the Ovary, Martinus Nijhoff publishers, The Hague, pp. 121-137.

Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 122, 501-514.

Earp, H. S., Lee, L. W., Raymond, V. W., Blaisdell, J., Austin, K., and Grisham, J. W. (1986). EGF and retinoic acid stimulate EGF receptor synthesis. J Cell Biochem 10C, 129.

Eckert, D., Biermann, K., Nettersheim, D., Gillis, A. J., Steger, K., Jack, H. M., Muller, A. M., Looijenga, L. H., and Schorle, H. (2008). Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors. BMC Dev Biol 8, 106.

Eddie, S. L., Childs, A. J., Jabbour, H. N., and Anderson, R. A. (2012). Developmentally regulated IL6-type cytokines signal to germ cells in the human fetal ovary. Mol Hum Reprod 18, 88-95.

Eguizabal, C., Boyano, M. D., Diez-Torre, A., Andrade, R., Andollo, N., De Felici, M., and Arechaga, J. (2007). Interleukin-2 induces the proliferation of mouse primordial germ cells in vitro. Int J Dev Biol 51, 731-738.

Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E., and Heyting, C. (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. J Cell Biol 160, 657-670.

Enders, G. C., and May, J. J. (1994). Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. Dev Biol 163, 331-340.

Eppig, J. J., and O'Brien, M. J. (1996). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. Biol Reprod 54, 197-207.

Erdman, S. E., and Burtis, K. C. (1993). The Drosophila doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. EMBO J 12, 527-535.

Erickson, G. F., Hofeditz, C., Unger, M., Allen, W. R., and Dulbecco, R. (1985). A monoclonal antibody to a mammary cell line recognizes two distinct subtypes of ovarian granulosa cells. Endocrinology 117, 1490-1499.

Evtouchenko, L., Studer, L., Spenger, C., Dreher, E., and Seiler, R. W. (1996). A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. Cell Transplant 5, 453-464.

Ewen, K. A., and Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. Mol Cell Endocrinol 323, 76-93.

Farini, D., Scaldaferri, M. L., Iona, S., La Sala, G., and De Felici, M. (2005). Growth factors sustain primordial germ cell survival, proliferation and entering into meiosis in the absence of somatic cells. Dev Biol 285, 49-56.

Farini, D., La Sala, G., Tedesco, M., and De Felici, M. (2007). Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. Dev Biol 306, 572-583.

Felix, W. (1911). Die Entwicklung Der Harn-und Geschlechtsorgane, Hirzel eds, Leipzig

Feng, Y. M., Liang, G. J., Pan, B., Qin, X. S., Zhang, X. F., Chen, C. L., Li, L., Cheng, S. F., De Felici, M., and Shen, W. (2014). Notch pathway regulates female germ cell meiosis progression and early oogenesis events in fetal mouse. Cell Cycle 13, 782-791.

Filipponi, D., Hobbs, R. M., Ottolenghi, S., Rossi, P., Jannini, E. A., Pandolfi, P. P., and Dolci, S. (2007). Repression of kit expression by Plzf in germ cells. Mol Cell Biol 27, 6770-6781.

Fleming, N. I., Knower, K. C., Lazarus, K. A., Fuller, P. J., Simpson, E. R., and Clyne, C. D. (2010). Aromatase is a direct target of FOXL2: C134W in granulosa cell tumors via a single highly conserved binding site in the ovarian specific promoter. PLoS One 5, e14389.

Forabosco, A., Sforza, C., De Pol, A., Vizzotto, L., Marzona, L., and Ferrario, V. F. (1991). Morphometric study of the human neonatal ovary. Anat Rec 231, 201-208.

Ford, C. E., Jones, K. W., Polani, P. E., De Almeida, J. C., and Briggs, J. H. (1959a). A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). Lancet 1, 711-713.

Ford, C. E., Polani, P. E., Briggs, J. H., and Bishop, P. M. (1959b). A presumptive human XXY/XX mosaic. Nature 183, 1030-1032.

Fouquet, J. P., and Dang, D. C. (1980). A comparative study of the development of the fetal testis and ovary in the monkey (Macaca fascicularis). Reprod Nutr Dev 20, 1439-1459.

Fowler, P. A., Evans, L. W., Groome, N. P., Templeton, A., and Knight, P. G. (1998). A longitudinal study of maternal serum inhibin-A, inhibin-B, activin-A, activin-AB, pro-alphaC and follistatin during pregnancy. Hum Reprod 13, 3530-3536.

Fowler, P. A., Flannigan, S., Mathers, A., Gillanders, K., Lea, R. G., Wood, M. J., Maheshwari, A., Bhattacharya, S., Collie-Duguid, E. S., Baker, P. J., Monteiro, A., and O'Shaughnessy, P. J. (2009). Gene expression analysis of human fetal ovarian primordial follicle formation. J Clin Endocrinol Metab 94, 1427-1435.

Fowler, P.A., Anderson, R.A., Saunders, P.T., Kinnel, H., Mason, J.I., Evans, D.B., Bhattacharya, S., Flannigan, S., Franks, S., Monteiro, A., O'Shaughnessy, P.J. (2011). Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. J Clin Endocrinol Metab 96, 1754-62.

Francavilla, S., and Zamboni, L. (1985). Differentiation of mouse ectopic germinal cells in intra- and perigonadal locations. J Exp Zool 233, 101-109.

Francavilla, S., Cordeschi, G., Properzi, G., Concordia, N., Cappa, F., and Pozzi, V. (1990). Ultrastructure of fetal human gonad before sexual differentiation and during early testicular and ovarian development. J Submicrosc Cytol Pathol 22, 389-400.

Fujimoto, T., Miyayama, Y., and Fuyuta, M. (1977). The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. Anat Rec 188, 315-330.

Fulton, N., Martins da Silva, S. J., Bayne, R. A., and Anderson, R. A. (2005). Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary. J Clin Endocrinol Metab 90, 4664-4670.

Funkuda, T. (1976). Ultrastructure of primordial germ cells in human embryo. Virchows Arch B Cell Pathol 20, 85-89.

Fuss, A. (1911). Uber extraregionare Geschlechtszellen bei einem menschlichen Embryo von 4 Wochen. Anat Am 39, 407-409.

Fuss, A. (1912). Über die Geschlechtszellen des Menschen und der Säugetiere. Archiv für Mikroskopische Anatomie 81, a1-a23.

Gaemers, I. C., Sonneveld, E., van Pelt, A. M., Schrans, B. H., Themmen, A. P., van der Saag, P. T., and de Rooij, D. G. (1998). The effect of 9-cis-retinoic acid on proliferation and differentiation of a spermatogonia and retinoid receptor gene expression in the vitamin A-deficient mouse testis. Endocrinology 139, 4269-4276.

Gaskell, T. L., Esnal, A., Robinson, L. L. L., Anderson, R. A., and Saunders, P. T. K. (2004). Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. Biology of reproduction 71, 2012-2021.

Geber, S., Megale, R., Vale, F., Lanna, A. M., and Cabral, A. C. (2012). Variation in ovarian follicle density during human fetal development. J Assist Reprod Genet 29, 969-972.

Gennet, N., Gale, E., Nan, X., Farley, E., Takacs, K., Oberwallner, B., Chambers, D., and Li, M. (2011). Doublesex and mab-3-related transcription factor 5 promotes midbrain dopaminergic identity in pluripotent stem cells by enforcing a ventral-medial progenitor fate. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 9131-9136.

Georges, A., Auguste, A., Bessiere, L., Vanet, A., Todeschini, A. L., and Veitia, R. A. (2014). FOXL2: a central transcription factor of the ovary. J Mol Endocrinol 52, R17-R33.

Georges, F. W., and Wilson, J. D. (1994). The Physiology of Reproduction. Knobil, E. a. N., JD (eds), ed. (New York: Raven Press), pp. 3-28.

Gill, M. E., Hu, Y. C., Lin, Y., and Page, D. C. (2011). Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 7443-7448.

Gill, W. B., Schumacher, G. F., Bibbo, M., Straus, F. H., and Schoenberg, H. W. (1979). Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. J Urol 122, 36-39.

Gillis, A. J., Stoop, H., Biermann, K., van Gurp, R. J., Swartzman, E., Cribbes, S., Ferlinz, A., Shannon, M., Oosterhuis, J. W., and Looijenga, L. H. (2011). Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. Int J Androl 34, e160-e174.

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

Giusti, R. M., Iwamoto, K., and Hatch, E. E. (1995). Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. Ann Intern Med 122, 778-788.

Godin, I., and Wylie, C. C. (1991). TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. Development 113, 1451-1457.

Goedecke, W., Eijpe, M., Offenberg, H. H., van Aalderen, M., and Heyting, C. (1999). Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. Nat Genet 23, 194-198.

Gohbara, A., Katagiri, K., Sato, T., Kubota, Y., Kagechika, H., Araki, Y., Araki, Y., and Ogawa, T. (2010). In vitro murine spermatogenesis in an organ culture system. Biol Reprod 83, 261-267.

Gondos, B. (1973). Germ cell degeneration and intercellular bridges in the human fetal ovary. Z Zellforsch Mikrosk Anat 138, 23-30.

Gondos, B., Rao, A., and Ramachandran, J. (1980). Effects of antiserum to luteinizing hormone on the structure and function of rat Leydig cells. J Endocrinol 87, 265-270.

Gondos, B., Westergaard, L., and Byskov, A. G. (1986). Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. Am J Obstet Gynecol 155, 189-195.

Gook, D. A., McCully, B. A., Edgar, D. H., and McBain, J. C. (2001). Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. Hum Reprod 16, 417-422.

Gook, D. A., Edgar, D. H., Borg, J., Archer, J., Lutjen, P. J., and McBain, J. C. (2003). Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. Hum Reprod 18, 1772-1781.

Gruhn, J. R., Rubio, C., Broman, K. W., Hunt, P. A., and Hassold, T. (2013). Cytological studies of human meiosis: sex-specific differences in recombination originate at, or prior to, establishment of double-strand breaks. PLoS One 8, e85075.

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990a). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 346, 245-250.

Gubbay, J., Koopman, P., Collignon, J., Burgoyne, P., and Lovell-Badge, R. (1990b). Normal structure and expression of Zfy genes in XY female mice mutant in Tdy. Development 109, 647-653.

Guerquin, M. J., Duquenne, C., Lahaye, J. B., Tourpin, S., Habert, R., and Livera, G. (2010). New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. Dev Biol 346, 320-330.

Haber, D. A., Buckler, A. J., Glaser, T., Call, K. M., Pelletier, J., Sohn, R. L., Douglass, E. C., and Housman, D. E. (1990). An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. Cell 61, 1257-1269.

Habert, R., Devif, I., Gangnerau, M. N., and Lecerf, L. (1991). Ontogenesis of the in vitro response of rat testis to gonadotropin-releasing hormone. Mol Cell Endocrinol 82, 199-206.

Habert, R., Muczynski, V., Tiphany, G., Moison, D., Messiaen, S., Frydman, R., Benachi, A., Delbes, G., Lambrot, R., Lehraiki, A., N'tumba-Byn, T., Guerquin, M. J., Levacher, C., Rouiller-Fabre, V., and Livera, G. (2014). Concerns with the widespread use of rodent models for human risk assess of Endocrine Disruptors. Reproduction 147, 119-129

Hackett, J. A., Reddington, J. P., Nestor, C. E., Dunican, D. S., Branco, M. R., Reichmann, J., Reik, W., Surani, M. A., Adams, I. R., and Meehan, R. R. (2012a). Promoter DNA methylation couples genome-defence mechanisms to epigenetic reprogramming in the mouse germline. Development 139, 3623-3632.

Hackett, J. A., Zylicz, J. J., and Surani, M. A. (2012b). Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. Trends Genet 28, 164-174.

Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R., and Hoog, C. (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. J Cell Sci 119, 4025-4032.

Hanley, N. A., Ball, S. G., Clement-Jones, M., Hagan, D. M., Strachan, T., Lindsay, S., Robson, S., Ostrer, H., Parker, K. L., and Wilson, D. I. (1999). Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. Mech Dev 87, 175-180.

Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M., Ball, S. G., Strachan, T., Salas-Cortes, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H., and Wilson, D. I. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. Mech Dev 91, 403-407.

Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P., and Jackson, C. M. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. The Anatomical Record 1, 116-128.

Hashimoto, N., Kubokawa, R., Yamazaki, K., Noguchi, M., and Kato, Y. (1990). Germ cell deficiency causes testis cord differentiation in reconstituted mouse fetal ovaries. J Exp Zool 253, 61-70.

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell 146, 519-532.

Heikkila, M., Prunskaite, R., Naillat, F., Itaranta, P., Vuoristo, J., Leppaluoto, J., Peltoketo, H., and Vainio, S. (2005). The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. Endocrinology 146, 4016-4023.

Hiller, M., Liu, C., Blumenthal, P. D., Gearhart, J. D., and Kerr, C. L. (2011). Bone morphogenetic protein 4 mediates human embryonic germ cell derivation. Stem Cells Dev 20, 351-361.

Hoang-Ngoc, M., Smadja, A., Herve de Sigalony, J. P., and Orcel, L. (1989). [Histologic study of the gonads in ovarian differentiation during organogenesis]. Arch Anat Cytol Pathol 37, 201-207.

Holm, P. B. (1986). Ultrastructural analysis of meiotic recombination and chiasma formation. Tokai J Exp Clin Med 11, 415-436.

Hopf, C., Viebahn, C., and Puschel, B. (2011). BMP signals and the transcriptional repressor BLIMP1 during germline segregation in the mammalian embryo. Dev Genes Evol 221, 209-223.

Horvay, K., Claussen, M., Katzer, M., Landgrebe, J., and Pieler, T. (2006). Xenopus Dead end mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. Dev Biol 291, 1-11.

Howell, J. M., Thompson, J. N., and Pitt, G. A. (1963). Histology of the lesions produced in the reproductive tract of animals fed a diet deficient in vitamin A alcohol but containing vitamin A acid. I. The male rat. J Reprod Fertil 5, 159-167.

Hoyer, P. E., Byskov, A. G., and Mollgard, K. (2005). Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. Mol Cell Endocrinol 234, 1-10.

Huang, X., Hong, C. S., O'Donnell, M., and Saint-Jeannet, J. P. (2005). The doublesex-related gene, XDmrt4, is required for neurogenesis in the olfactory system. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 11349-11354.

Huhtaniemi, I., and Pelliniemi, L. J. (1992). Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. Proc Soc Exp Biol Med 201, 125-140.

Ikenishi, K. (1998). Germ plasm in Caenorhabditis elegans, Drosophila and Xenopus. Dev Growth Differ 40, 1-10.

Jacobs, P. A., and Strong, J. A. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature 183, 302-303.

Jameson, S. A., Lin, Y. T., and Capel, B. (2012). Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. Dev Biol 370, 24-32.

Jeanes, A., Wilhelm, D., Wilson, M. J., Bowles, J., McClive, P. J., Sinclair, A. H., and Koopman, P. (2005). Evaluation of candidate markers for the peritubular myoid cell lineage in the developing mouse testis. Reproduction 130, 509-516.

Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalon, A., Fernandez, M. F., Olea, N., and Vilchez, J. L. (2010). Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 878, 3363-3369.

Jordan, B. K., Mohammed, M., Ching, S. T., Delot, E., Chen, X. N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P. N., Elejalde, B. R., and Vilain, E. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. Am J Hum Genet 68, 1102-1109.

Jorgensen, A., Nielsen, J. E., Jensen, M. B., Graem, N., and Rajpert-De Meyts, E. (2012). Analysis of meiosis regulators in human gonads: a sexually dimorphic spatio-temporal expression pattern suggests involvement of DMRT1 in meiotic entry. Mol Hum Reprod 18, 523-534.

Josso, N. (1973). In vitro synthesis of mullerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. Endocrinology 93, 829-834.

Kalfa, N., Paris, F., Soyer-Gobillard, M. O., Daures, J. P., and Sultan, C. (2011). Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. Fertil Steril 95, 2574-2577.

Kamat, A., Alcorn, J. L., Kunczt, C., and Mendelson, C. R. (1998). Characterization of the regulatory regions of the human aromatase (P450arom) gene involved in placenta-specific expression. Mol Endocrinol 12, 1764-1777.

Kandaraki, E., Chatzigeorgiou, A., Livadas, S., Palioura, E., Economou, F., Koutsilieris, M., Palimeri, S., Panidis, D., and Diamanti-Kandarakis, E. (2011). Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. J Clin Endocrinol Metab 96, E480-E484.

Kashimada, K., Pelosi, E., Chen, H., Schlessinger, D., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2011a). FOXL2 and BMP2 act cooperatively to regulate follistatin gene expression during ovarian development. Endocrinology 152, 272-280.

Kashimada, K., Svingen, T., Feng, C. W., Pelosi, E., Bagheri-Fam, S., Harley, V. R., Schlessinger, D., Bowles, J., and Koopman, P. (2011b). Antagonistic regulation of Cyp26b1 by transcription factors SOX9/SF1 and FOXL2 during gonadal development in mice. FASEB J 25, 3561-3569.

Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M., and Sasaki, H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. Hum Mol Genet 16, 2272-2280.

Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Shiroishi, T., Nakahara, Y., Hashimoto, N., Noguchi, K., and Higashinakagawa, T. (1998). Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. Nature 393, 688-692.

Katoh-Fukui, Y., Owaki, A., Toyama, Y., Kusaka, M., Shinohara, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., and Morohashi, K. (2005). Mouse Polycomb M33 is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating Ad4BP/SF1 expression. Blood 106, 1612-1620.

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

Kedde, M., Strasser, M. J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J. A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P. M., van Duijse, J., Orom, U. A., Lund, A. H., Perrakis, A., Raz, E., and Agami, R. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. Cell 131, 1273-1286.

Kee, K., Gonsalves, J. M., Clark, A. T., and Pera, R. A. (2006). Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. Stem Cells Dev 15, 831-837.

Kee, K., Angeles, V. T., Flores, M., Nguyen, H. N., and Reijo Pera, R. A. (2009). Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. Nature 462, 222-225.

Keeney, S. (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. Curr Top Dev Biol 52, 1-53.

Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Scholer, H. R., and Tomilin, A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. EMBO Rep 5, 1078-1083.

Kerr, C. L., Hill, C. M., Blumenthal, P. D., and Gearhart, J. D. (2008a). Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis. Stem Cells 26, 412-421.

Kerr, C. L., Hill, C. M., Blumenthal, P. D., and Gearhart, J. D. (2008b). Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary. Hum Reprod 23, 589-599.

Kim, S., Kettlewell, J. R., Anderson, R. C., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2003a). Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. Gene Expr Patterns 3, 77-82.

Kim, S., Kettlewell, J. R., Anderson, R. C., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2003b). Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. Gene Expression Patterns 3, 77-82.

Kim, S. S., Kang, H. G., Kim, N. H., Lee, H. C., and Lee, H. H. (2005). Assessment of the integrity of human oocytes retrieved from cryopreserved ovarian tissue after xenotransplantation. Hum Reprod 20, 2502-2508.

Kim, S., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2007a). Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation. Dev Biol 307, 314-327.

Kim, S., Namekawa, S. H., Niswander, L. M., Ward, J. O., Lee, J. T., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2007b). A mammal-specific Doublesex homolog associates with male sex chromatin and is required for male meiosis. PLoS Genet 3, e62.

Kim, Y., and Capel, B. (2006). Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: a new perspective on an old problem. Dev Dyn 235, 2292-2300.

Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M. C., Poulat, F., Behringer, R. R., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. PLoS Biol 4, e187.

Kimura, T., Nakamura, T., Murayama, K., Umehara, H., Yamano, N., Watanabe, S., Taketo, M. M., and Nakano, T. (2006). The stabilization of beta-catenin leads to impaired primordial germ cell development via aberrant cell cycle progression. Dev Biol 300, 545-553.

Klip, H., Verloop, J., van Gool, J. D., Koster, M. E., Burger, C. W., and van Leeuwen, F. E. (2002). Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. Lancet 359, 1102-1107.

Kolas, N. K., Yuan, L., Hoog, C., Heng, H. H., Marcon, E., and Moens, P. B. (2004). Male mouse meiotic chromosome cores deficient in structural proteins SYCP3 and SYCP2 align by homology but fail to synapse and have possible impaired specificity of chromatin loop attachment. Cytogenet Genome Res 105, 182-188.

Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 351, 117-121.

Koshimizu, U., Watanabe, M., and Nakatsuji, N. (1995). Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. Dev Biol 168, 683-685.

Koshimizu, U., Taga, T., Watanabe, M., Saito, M., Shirayoshi, Y., Kishimoto, T., and Nakatsuji, N. (1996). Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells in vitro and derivation of embryonic germ (EG) cells. Development 122, 1235-1242.

Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., and Page, D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2474-2479.

Koyanagi, T., Suzuki, Y., Saga, Y., Machida, S., Takei, Y., Fujiwara, H., Suzuki, M., and Sato, Y. (2013). In vivo delivery of siRNA targeting vasohibin-2 decreases tumor angiogenesis and suppresses tumor growth in ovarian cancer. Cancer Sci 104, 1705-10

Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. Cell 74, 679-691.

Krentz, A. D., Murphy, M. W., Kim, S., Cook, M. S., Capel, B., Zhu, R., Matin, A., Sarver, A. L., Parker, K. L., Griswold, M. D., Looijenga, L. H., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2009). The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 22323-22328.

Krentz, A. D., Murphy, M. W., Sarver, A. L., Griswold, M. D., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2011). DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary. Dev Biol 356, 63-70.

Kumar, R., Bourbon, H. M., and de Massy, B. (2010). Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. Genes Dev 24, 1266-1280.

Kumar, S., Sandell, L. L., Trainor, P. A., Koentgen, F., and Duester, G. (2012). Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. Biochim Biophys Acta 1821, 198-205.

Kurilo, L. F. (1981). Oogenesis in antenatal development in man. Hum Genet 57, 86-92.

Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K., and Saitou, M. (2008a). Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. Genes Dev 22, 1617-1635.

Kurimoto, K., Yamaji, M., Seki, Y., and Saitou, M. (2008b). Specification of the germ cell lineage in mice: a process orchestrated by the PR-domain proteins, Blimp1 and Prdm14. Cell Cycle 7, 3514-3518.

Laird, D. J., Altshuler-Keylin, S., Kissner, M. D., Zhou, X., and Anderson, K. V. (2011). Ror2 enhances polarity and directional migration of primordial germ cells. PLoS Genet 7, e1002428.

Lakhal, B., Ben-Hadj-Khalifa, S., Bouali, N., Braham, R., Hatem, E., Saad, A. (2012). Mutational screening of SF1 and WNT4 in Tunisian women with premature ovarian failure. Gene 509, 298-301.

Lambrot, R., Livera, G., Coffigny, H., Pairault, C., Frydman, R., Habert, R., and Rouiller-Fabre, V. (2006). A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. Biochimie 88, 1831-1835.

Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Lecureuil, C., Frydman, R., Habert, R., and Rouiller-Fabre, V. (2007). High radiosensitivity of germ cells in human male fetus. J Clin Endocrinol Metab 92, 2632-2639.

Lan, C., Xiao, W., Xiao-Hui, D., Chun-Yan, H., and Hong-Ling, Y. (2010). Tissue culture before transplantation of frozen-thawed human fetal ovarian tissue into immunodeficient mice. Fertil Steril 93, 913-919.

Landen, C. N., Merritt, W. M., Mangala, L. S., Sanguino, A. M., Bucana, C., Lu, C., Lin, Y. G., Han, L. Y., Kamat, A. A., Schmandt, R., Coleman, R. L., Gershenson, D. M., Lopez-Berestein, G., and Sood, A. K. (2006). Intraperitoneal delivery of liposomal siRNA for therapy of advanced ovarian cancer. Cancer Biol Ther 5, 1708-1713.

Lavery, R., Chassot, A. A., Pauper, E., Gregoire, E. P., Klopfenstein, M., de Rooij, D. G., Mark, M., Schedl, A., Ghyselinck, N. B., and Chaboissier, M. C. (2012). Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. PLoS Genet 8, e1003170.

Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P., and Hogan, B. L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes Dev 13, 424-436.

Le Bouffant, R., Guerquin, M. J., Duquenne, C., Frydman, N., Coffigny, H., Rouiller-Fabre, V., Frydman, R., Habert, R., and Livera, G. (2010). Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. Hum Reprod 25, 2579-2590.

Le Bouffant, R., Souquet, B., Duval, N., Duquenne, C., Herve, R., Frydman, N., Robert, B., Habert, R., and Livera, G. (2011). Msx1 and Msx2 promote meiosis initiation. Development 138, 5393-5402.

Le Caignec, C., Delnatte, C., Vermeesch, J. R., Boceno, M., Joubert, M., Lavenant, F., David, A., and Rival, J. M. (2007). Complete sex reversal in a WAGR syndrome patient. Am J Med Genet A 143A, 2692-2695.

Lecerf, L., Rouiller-Fabre, V., Levacher, C., Gautier, C., Saez, J. M., and Habert, R. (1993). Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on basal and luteinizing hormone-stimulated testosterone secretions by the fetal rat testis in vitro. Endocrinology 133, 2313-2318.

Ledig, S., Hiort, O., Wunsch, L., and Wieacker, P. (2012). Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. Eur J Endocrinol 167, 119-124.

Leers-Sucheta, S., Morohashi, K., Mason, J. I., and Melner, M. H. (1997). Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. J Biol Chem 272, 7960-7967.

Lei, N., Hornbaker, K. I., Rice, D. A., Karpova, T., Agbor, V. A., and Heckert, L. L. (2007). Sex-specific differences in mouse DMRT1 expression are both cell type- and stage-dependent during gonad development. Biol Reprod 77, 466-475.

Leitch, H. G., Tang, W. W., and Surani, M. A. (2013). Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals. Curr Top Dev Biol 104, 149-187.

Lesch, B. J., Dokshin, G. A., Young, R. A., McCarrey, J. R., and Page, D. C. (2013). A set of genes critical to development is epigenetically poised in mouse germ cells from fetal stages through completion of meiosis. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 16061-16066.

Li, M. H., Yang, H. H., Li, M. R., Sun, Y. L., Jiang, X. L., Xie, Q. P., Wang, T. R., Shi, H. J., Sun, L. N., Zhou, L. Y., and Wang, D. S. (2013). Antagonistic roles of Dmrt1 and Foxl2 in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs. Endocrinology 154, 4814-4825.

Libby, B. J., De La Fuente, R., O'Brien, M. J., Wigglesworth, K., Cobb, J., Inselman, A., Eaker, S., Handel, M. A., Eppig, J. J., and Schimenti, J. C. (2002). The mouse meiotic mutation mei1 disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. Dev Biol 242, 174-187.

Lin, Y., Gill, M. E., Koubova, J., and Page, D. C. (2008). Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. Science 322, 1685-1687.

Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Durand, P., and Habert, R. (2000). Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. Biol Reprod 62, 1303-1314.

Lo, J. C., Schwitzgebel, V. M., Tyrrell, J. B., Fitzgerald, P. A., Kaplan, S. L., Conte, F. A., and Grumbach, M. M. (1999). Normal female infants born of mothers with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 84, 930-936.

Looijenga, L. H., Gillis, A. J., van Gurp, R. J., Verkerk, A. J., and Oosterhuis, J. W. (1997). X inactivation in human testicular tumors. XIST expression and androgen receptor methylation status. Am J Pathol 151, 581-590.

Lopes, A. M., Aston, K. I., Thompson, E., Carvalho, F., Goncalves, J., Huang, N., Matthiesen, R., Noordam, M. J., Quintela, I., Ramu, A., Seabra, C., Wilfert, A. B., Dai, J., Downie, J. M., Fernandes, S., Guo, X., Sha, J., Amorim, A., Barros, A., Carracedo, A., Hu, Z., Hurles, M. E., Moskovtsev, S., Ober, C., Paduch, D. A., Schiffman, J. D., Schlegel, P. N., Sousa, M., Carrell, D. T., and Conrad, D. F. (2013). Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene DMRT1. PLoS Genet 9, e1003349.

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

Lovell-Badge, R. (1992). The role of Sry in mammalian sex determination. Ciba Found Symp 165, 162-79; discussion 179.

Ludbrook, L. M., Bernard, P., Bagheri-Fam, S., Ryan, J., Sekido, R., Wilhelm, D., Lovell-Badge, R., and Harley, V. R. (2012). Excess DAX1 leads to XY ovotesticular disorder of sex development (DSD) in mice by inhibiting steroidogenic factor-1 (SF1) activation of the testis enhancer of SRY-box-9 (Sox9). Endocrinology 153, 1948-1958.

Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell 77, 481-490.

MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P., and Petkovich, M. (2007). Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. Endocrinology 148, 4560-4567.

Maheshwari, A., and Fowler, P. A. (2008). Primordial follicular assembly in humans--revisited. Zygote 16, 285-296.

Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Mejean, C., Berta, P., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. EMBO J 24, 1798-1809.

Mamsen, L. S., Lutterodt, M. C., Andersen, E. W., Skouby, S.O. Sorensen, K. P., Andersen, C. Y., Byskov, A. G. (2010). Cigarette smoking during pregnancy reduces the number of embryonic germ and somatic cells. Hum Reprod 25, 2744-61.

Mamsen, L. S., Lutterodt, M. C., Andersen, E. W., Byskov, A. G., and Andersen, C. Y. (2011). Germ cell numbers in human embryonic and fetal gonads during the first two trimesters of pregnancy: analysis of six published studies. Hum Reprod 26, 2140-2145.

Mamsen, L. S., Brochner, C. B., Byskov, A. G., and Mollgard, K. (2012). The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. Int J Dev Biol 56, 771-778.

Mandel, H., Shemer, R., Borochowitz, Z. U., Okopnik, M., Knopf, C., Indelman, M., Drugan, A., Tiosano, D., Gershoni-Baruch, R., Choder, M., and Sprecher, E. (2008). SERKAL

syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. Am J Hum Genet 82, 39-47.

Marciniak, B., Patro-Malysza, J., Poniedzialek-Czajkowska, E., Kimber-Trojnar, Z., Leszczynska-Gorzelak, B., and Oleszczuk, J. (2011). Glucocorticoids in pregnancy. Curr Pharm Biotechnol 12, 750-757.

Masson, J. Y., and West, S. C. (2001). The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship. Trends Biochem Sci 26, 131-136.

Matson, C. K., Murphy, M. W., Griswold, M. D., Yoshida, S., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2010). The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. Dev Cell 19, 612-624.

Matson, C. K., Murphy, M. W., Sarver, A. L., Griswold, M. D., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. Nature 476, 101-104.

Matsui, Y., Zsebo, K. M., and Hogan, B. L. (1990). Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. Nature 347, 667-669.

Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell 70, 841-847.

Maximow, A. (1925). Tissue-cultures of Young Mammalian Embryos, Carnegie Institution eds, Washington.

Mazaud, S., Oreal, E., Guigon, C. J., Carre-Eusebe, D., and Magre, S. (2002). Lhx9 expression during gonadal morphogenesis as related to the state of cell differentiation. Gene Expr Patterns 2, 373-377.

McKay, D. G., Hertig, A. T., Adams, E. C., and Danziger, S. (1953). Histochemical observations on the germ cells of human embryos. Anat Rec 117, 201-219.

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

McLaren, A., and Buehr, M. (1990). Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. Cell Differ Dev 31, 185-195.

McLaren, A., and Southee, D. (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. Dev Biol 187, 107-113.

Menke, D. B., Koubova, J., and Page, D. C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. Dev Biol 262, 303-312.

Merchant, H. (1975). Rat gonadal and ovarioan organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. Dev Biol 44, 1-21.

Mitchell, R. T., Saunders, P. T., Childs, A. J., Cassidy-Kojima, C., Anderson, R. A., Wallace, W. H., Kelnar, C. J., and Sharpe, R. M. (2010). Xenografting of human fetal testis tissue: a new approach to study fetal testis development and germ cell differentiation. Hum Reprod 25, 2405-2414.

Mitchell, R. T., Childs, A. J., Anderson, R. A., van den Driesche, S., Saunders, P. T., McKinnell, C., Wallace, W. H., Kelnar, C. J., and Sharpe, R. M. (2012). Do phthalates affect steroidogenesis by the human fetal testis? Exposure of human fetal testis xenografts to di-n-butyl phthalate. J Clin Endocrinol Metab 97, E341-E348.

Mitchell, R. T., Sharpe, R. M., Anderson, R. A., McKinnell, C., Macpherson, S., Smith, L. B., Wallace, W. H., Kelnar, C. J., and van den Driesche, S. (2013). Diethylstilboestrol exposure does not reduce testosterone production in human fetal testis xenografts. PLoS One 8, e61726.

Mitsunaga, K., Araki, K., Mizusaki, H., Morohashi, K., Haruna, K., Nakagata, N., Giguere, V., Yamamura, K., and Abe, K. (2004). Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR-beta results in reduction of germ cell number in mouse embryos. Mech Dev 121, 237-246.

Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I., and Aizawa, S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. Development 124, 1653-1664.

Mollgard, K., Jespersen, A., Lutterodt, M. C., Yding Andersen, C., Hoyer, P. E., and Byskov, A. G. (2010). Human primordial germ cells migrate along nerve fibers and Schwann cells from the dorsal hind gut mesentery to the gonadal ridge. Mol Hum Reprod 16, 621-631.

Molyneaux, K. A., Stallock, J., Schaible, K., and Wylie, C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. Dev Biol 240, 488-498.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell 68, 869-877.

Montazer-Torbati, F., Kocer, A., Auguste, A., Renault, L., Charpigny, G., Pailhoux, E., and Pannetier, M. (2010). A study of goat SRY protein expression suggests putative new roles for this gene in the developing testis of a species with long-lasting SRY expression. Dev Dyn 239, 3324-3335.

Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., and Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nat Genet 14, 62-68.

Morgan, T. H., Sturtevant, A. H., Muller, H. J., and Bridges, C. B. (1915). The mechanism of Mendelian heredity. Payne: Variations and Selection 45, 262.

Morohashi, K., Zanger, U. M., Honda, S., Hara, M., Waterman, M. R., and Omura, T. (1993). Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. Mol Endocrinol 7, 1196-1204.

Moses, M. J. (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J Biophys Biochem Cytol 2, 215-218.

Motta, P. M., and Makabe, S. (1982). Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus. A correlated study by scanning and transmission electron microscopy. Cell Tissue Res 226, 493-510.

Mu, X., Wen, J., Guo, M., Wang, J., Li, G., Wang, Z., Wang, Y., Teng, Z., Cui, Y., and Xia, G. (2013). Retinoic acid derived from the fetal ovary initiates meiosis in mouse germ cells. J Cell Physiol 228, 627-639.

Murphy, M. W., Zarkower, D., and Bardwell, V. J. (2007). Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA. BMC Mol Biol 8, 58.

Myllymaki, S., Haavisto, T., Vainio, M., Toppari, J., and Paranko, J. (2005). In vitro effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-tert-butylphenol, and 4-tert-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles. Toxicol Appl Pharmacol 204, 69-80.

Nakaki, F., Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Yabuta, Y., and Saitou, M. (2013). Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. Nature 501, 222-226.

Nakatsuji, N., and Chuma, S. (2001). Differentiation of mouse primordial germ cells into female or male germ cells. Int J Dev Biol 45, 541-548.

Nelson, W. J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science 303, 1483-1487.

Nilsson, E. E., and Skinner, M. K. (2002). Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. Biol Reprod 67, 1018-1024.

Nilsson, E., Zhang, B., and Skinner, M. K. (2013). Gene bionetworks that regulate ovarian primordial follicle assembly. BMC Genomics 14, 496.

Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Qu, J., Motta, P., and Donnez, J. (2000). Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. Fertil Steril 74, 122-129.

Ogata, T., Muroya, K., Ohashi, H., Mochizuki, H., Hasegawa, T., and Kaji, M. (2001). Female gonadal development in XX patients with distal 9p monosomy. Eur J Endocrinol 145, 613-617.

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., and Surani, M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. Nature 436, 207-213.

Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., and Saitou, M. (2009). A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. Cell 137, 571-584.

Oktem, O., and Oktay, K. (2007). A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. Cancer Res 67, 10159-10162.

Olaso, R., Pairault, C., and Habert, R. (1998). Expression of type I and II receptors for transforming growth factor beta in the adult rat testis. Histochem Cell Biol 110, 613-618.

Oreal, E., Pieau, C., Mattei, M. G., Josso, N., Picard, J. Y., Carre-Eusebe, D., and Magre, S. (1998). Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. Dev Dyn 212, 522-532.

Ostrer, H., Huang, H. Y., Masch, R. J., and Shapiro, E. (2007). A cellular study of human testis development. Sex Dev 1, 286-292.

Ottolenghi, C., Fellous, M., Barbieri, M., and McElreavey, K. (2002). Novel paralogy relations among human chromosomes support a link between the phylogeny of doublesex-related genes and the evolution of sex determination. Genomics 79, 333-343.

Ottolenghi, C., Pelosi, E., Tran, J., Colombino, M., Douglass, E., Nedorezov, T., Cao, A., Forabosco, A., and Schlessinger, D. (2007). Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. Hum Mol Genet 16, 2795-2804.

Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Gansmuller, A., Heyberger, S., Dolle, P., Bronner, S., Lutz, Y., and Chambon, P. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. J Cell Biol 135, 469-477.

Ounap, K., Uibo, O., Zordania, R., Kiho, L., Ilus, T., Oiglane-Shlik, E., and Bartsch, O. (2004). Three patients with 9p deletions including DMRT1 and DMRT2: a girl with XY complement, bilateral ovotestes, and extreme growth retardation, and two XX females with normal pubertal development. Am J Med Genet A 130A, 415-423.

Page, D. C., Mosher, R., Simpson, E. M., Fisher, E. M., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., de la Chapelle, A., and Brown, L. G. (1987). The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. Cell 51, 1091-1104.

Palmer, J. R., Wise, L. A., Robboy, S. J., Titus-Ernstoff, L., Noller, K. L., Herbst, A. L., Troisi, R., and Hoover, R. N. (2005). Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero. Epidemiology 16, 583-586.

Palmer, J. R., Herbst, A. L., Noller, K. L., Boggs, D. A., Troisi, R., Titus-Ernstoff, L., Hatch, E. E., Wise, L. A., Strohsnitter, W. C., and Hoover, R. N. (2009). Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. Environ Health 8, 37.

Palmer, M. S., Sinclair, A. H., Berta, P., Ellis, N. A., Goodfellow, P. N., Abbas, N. E., and Fellous, M. (1989). Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. Nature 342, 937-939.

Palmer, S. J., and Burgoyne, P. S. (1991a). XY follicle cells in the ovaries of XO/XY and XO/XY/XYY mosaic mice. Development 111, 1017-1019.

Palmer, S. J., and Burgoyne, P. S. (1991b). In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX---XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. Development 112, 265-268.

Paredes, A., Garcia-Rudaz, C., Kerr, B., Tapia, V., Dissen, G. A., Costa, M. E., Cornea, A., and Ojeda, S. R. (2005). Loss of synaptonemal complex protein-1, a synaptonemal complex protein, contributes to the initiation of follicular assembly in the developing rat ovary. Endocrinology 146, 5267-5277.

Parlier, D., Moers, V., Van Campenhout, C., Preillon, J., Leclere, L., Saulnier, A., Sirakov, M., Busengdal, H., Kricha, S., Marine, J. C., Rentzsch, F., and Bellefroid, E. J. (2013). The Xenopus doublesex-related gene Dmrt5 is required for olfactory placode neurogenesis. Dev Biol 373, 39-52.

Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M. C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., and Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. Nat Genet 38, 1304-1309.

Pauls, K., Jager, R., Weber, S., Wardelmann, E., Koch, A., Buttner, R., and Schorle, H. (2005). Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors. Int J Cancer 115, 470-477.

Pauls, K., Schorle, H., Jeske, W., Brehm, R., Steger, K., Wernert, N., Buttner, R., and Zhou, H. (2006). Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. Hum Reprod 21, 397-404.

Pelliniemi, L. J., and Lauteala, L. (1981). Development of sexual dimorphism in the embryonic gonad. Hum Genet 58, 64-67.

Pepling, M. E., and Spradling, A. C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. Development 125, 3323-3328.

Pepling, M. E., and Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. Dev Biol 234, 339-351.

Peretz, J., and Flaws, J. A. (2013). Bisphenol A down-regulates rate-limiting Cyp11a1 to acutely inhibit steroidogenesis in cultured mouse antral follicles. Toxicol Appl Pharmacol 271, 249-256.

Perrett, R. M., Turnpenny, L., Eckert, J. J., O'Shea, M., Sonne, S. B., Cameron, I. T., Wilson, D. I., Rajpert-De Meyts, E., and Hanley, N. A. (2008). The early human germ cell lineage does not express SOX2 during in vivo development or upon in vitro culture. Biol Reprod 78, 852-858.

Pesce, M., Cerrito, M. G., Travia, G., Russo, M. A., and De Felici, M. (1996). In vitro development of growing oocytes from fetal and early postnatal mouse ovaries. Int J Dev Biol Suppl 1, 229S-230S.

Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D. J., and Scholer, H. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. Mech Dev 71, 89-98.

Peters, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrinol 62, 98-116.

Pezzi, N., Prieto, I., Kremer, L., Perez Jurado, L. A., Valero, C., Del Mazo, J., Martinez-A, C., and Barbero, J. L. (2000). STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. FASEB J 14, 581-592.

Pierik, F. H., Burdorf, A., Nijman, J. M., de Muinck Keizer-Schrama, S. M., Juttmann, R. E., and Weber, R. F. (2002). A high hypospadias rate in The Netherlands. Hum Reprod 17, 1112-1115.

Pilon, N., Daneau, I., Paradis, V., Hamel, F., Lussier, J. G., Viger, R. S., and Silversides, D. W. (2003). Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. Biol Reprod 68, 1098-1106.

Politzer, G. (1928). Über einen menschlichen Embryo mit 18 Ursegmentpaaren. Anatomy and Embryology 87, 674-727.

Politzer, G. (1930). Über einen menschlichen Embryo mit sieben Urwirbelpaaren. Anatomy and Embryology 93, 386-428.

Politzer, G. (1933). Die Keimbahn des Menschen. Anatomy and Embryology 100, 331-361.

Povlsen, C. O., Skakkebaek, N. E., Rygaard, J., and Jensen, G. (1974). Heterotransplantation of human foetal organs to the mouse mutant nude. nature 248, 247-249.

Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., Graem, N., Muller, J., Cate, R. L., and Skakkebaek, N. E. (1999). Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 84, 3836-3844.

Rajpert-De Meyts, E., Hanstein, R., Jorgensen, N., Graem, N., Vogt, P. H., and Skakkebaek, N. E. (2004). Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. Hum Reprod 19, 1338-1344.

Ramayya, M. S., Zhou, J., Kino, T., Segars, J. H., Bondy, C. A., and Chrousos, G. P. (1997). Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies. J Clin Endocrinol Metab 82, 1799-1806.

Ramos, C., and Robert, B. (2005). msh/Msx gene family in neural development. Trends Genet 21, 624-632.

Ratts, V. S., Flaws, J. A., Kolp, R., Sorenson, C. M., and Tilly, J. L. (1995). Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology 136, 3665-3668.

Raymond, C. S., Shamu, C. E., Shen, M. M., Seifert, K. J., Hirsch, B., Hodgkin, J., and Zarkower, D. (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. Nature 391, 691-695.

Raymond, C. S., Parker, E. D., Kettlewell, J. R., Brown, L. G., Page, D. C., Kusz, K., Jaruzelska, J., Reinberg, Y., Flejter, W. L., Bardwell, V. J., Hirsch, B., and Zarkower, D. (1999). A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. Hum Mol Genet 8, 989-996.

Raymond, C. S., Murphy, M. W., O'Sullivan, M. G., Bardwell, V. J., and Zarkower, D. (2000). Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. Genes Dev 14, 2587-2595.

Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L., and Donovan, P. J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. Nature 359, 550-551.

Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., Scherthan, H., and Jessberger, R. (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. Nat Cell Biol 6, 555-562.

Revenkova, E., and Jessberger, R. (2005). Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. Reproduction 130, 783-790.

Richards, A. J., Enders, G. C., and Resnick, J. L. (1999). Activin and TGFbeta limit murine primordial germ cell proliferation. Dev Biol 207, 470-475.

Richardson, B. E., and Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 37-49.

Ristic, N., Nestorovic, N., Manojlovic-Stojanoski, M., Filipovic, B., Sosic-Jurjevic, B., Milosevic, V., and Sekulic, M. (2008). Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. J Microsc 232, 549-557.

Robertson, N. M., Bodine, P. V., Hsu, T. C., Alnemri, E. S., and Litwack, G. (1995). Modulator inhibits nuclear translocation of the glucocorticoid receptor and inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in the human leukemic cell line CEM C-7. Cancer Res 55, 548-556.

Rolland, M., Le Moal, J., Wagner, V., Royere, D., and De Mouzon, J. (2013). Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. Hum Reprod 28, 462-470.

Ross, A., Munger, S., and Capel, B. (2007). Bmp7 regulates germ cell proliferation in mouse fetal gonads. Sex Dev 1, 127-137.

Ruby, J. R., Dyer, R. F., and Skalko, R. G. (1969). The occurrence of intercellular bridges during oogenesis in the mouse. J Morphol 127, 307-339.

Ruby, J. R., Dyer, R. F., Gasser, R. F., and Skalko, R. G. (1970). Intercellular connections between germ cells in the developing human ovary. Z Zellforsch Mikrosk Anat 105, 252-258.

Rygaard, J., and Povlsen, C. O. (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. Acta Pathol Microbiol Scand 77, 758-760.

Rygaard, J. (1974a). Skin grafts in nude mice. 2. Rat skin grafts in nude mice of three genetic backgrounds (BALB-c, C3H, C57-BL). The effects after preparation by thymus grafts. Acta Pathol Microbiol Scand A 82, 93-104.

Rygaard, J. (1974b). Skin grafts in nude mice. 3. Fate of grafts from man and donors of other taxonomic classes. Acta Pathol Microbiol Scand A 82, 105-112.

Saba, R., Kato, Y., and Saga, Y. (2014a). NANOS2 promotes male germ cell development independent of meiosis suppression. Dev Biol 385, 32-40.

Saba, R., Wu, Q., and Saga, Y. (2014b). CYP26B1 promotes male germ cell differentiation by suppressing STRA8-dependent meiotic and STRA8-independent mitotic pathways. Dev Biol 389, 173-181.

Sadeu, J. C., Cortvrindt, R., Ron-El, R., Kasterstein, E., and Smitz, J. (2006). Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. Fertil Steril 85 Suppl 1, 1130-1141.

Saitou, M. (2009). Germ cell specification in mice. Curr Opin Genet Dev 19, 386-395.

Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. Development 139, 15-31.

Salas-Cortes, L., Jaubert, F., Barbaux, S., Nessmann, C., Bono, M. R., Fellous, M., McElreavey, K., and Rosemblatt, M. (1999). The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. Int J Dev Biol 43, 135-140.

Sanlaville, D., Vialard, F., Thepot, F., Vue-Droy, L., Ardalan, A., Nizard, P., Corre, A., Devauchelle, B., Martin-Denavit, T., Nouchy, M., Malan, V., Taillemite, J. L., and Portnoi, M. F. (2004). Functional disomy of Xp including duplication of DAX1 gene with sex reversal due to t(X;Y)(p21.2;p11.3). Am J Med Genet A 128A(3), 325-330.

Sasaki, H., and Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. Nat Rev Genet 9, 129-140.

Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y., and Ogawa, T. (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature 471, 504-507.

Sato, T., Rocancourt, D., Marques, L., Thorsteinsdóttir, S., and Buckingham, M. (2010a). A Pax3/Dmrt2/Myf5 regulatory cascade functions at the onset of myogenesis. PLoS genetics 6, e1000897.

Sato, Y., Nozawa, S., Yoshiike, M., Arai, M., Sasaki, C., and Iwamoto, T. (2010b). Xenografting of testicular tissue from an infant human donor results in accelerated testicular maturation. Hum Reprod 25, 1113-1122.

Satoh, M. (1991). Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. J Anat 177, 85-107.

Saunders, P. T., Turner, J. M., Ruggiu, M., Taggart, M., Burgoyne, P. S., Elliott, D., and Cooke, H. J. (2003). Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. Reproduction 126, 589-597.

Schmahl, J., Eicher, E. M., Washburn, L. L., and Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. Development 127, 65-73.

Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A. C., and Treier, M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. Development 131, 933-942.

Schneider, D. T., Schuster, A. E., Fritsch, M. K., Hu, J., Olson, T., Lauer, S., Gobel, U., and Perlman, E. J. (2001). Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. Cancer Res 61, 7268-7276.

Scholer, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H., and Gruss, P. (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. EMBO J 9, 2185-2195.

Schreiber, J. R., Nakamura, K., and Erickson, G. F. (1982). Rat ovary glucocorticoid receptor: identification and characterization. Steroids 39, 569-584.

Sekido, R., Bar, I., Narvaez, V., Penny, G., and Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. Dev Biol 274, 271-279.

Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. Nature 453, 930-934.

Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2009). Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? Trends Genet 25, 19-29.

Shen, M. M., and Hodgkin, J. (1988). mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in C. elegans. Cell 54, 1019-1031.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et, a. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell 68, 855-867.

Simpson, E. R., Zhao, Y., Agarwal, V. R., Michael, M. D., Bulun, S. E., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Sun, T., Fisher, C. R., Qin, K., and Mendelson, C. R. (1997). Aromatase expression in health and disease. Recent Prog Horm Res 52, 185-213; discussion 213.

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346, 240-244.

Skakkebaek, N. E., Jensen, G., Povlsen, C. O., and Rygaard, J. (1974). Heterotransplantation of human foetal testicular and ovarian tissue to the mouse mutant nude. A preliminary study. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 29, 73-75.

Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., and Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod 16, 972-978.

Skrzypczak, J., Pisarski, T., Biczysko, W., and Kedzia, H. (1981). Evaluation of germ cells development in gonads of human fetuses and newborns. Folia Histochem Cytochem (Krakow) 19, 17-24.

Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J., and Sinclair, A. H. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. Nature 461, 267-271.

Soleimani, R., Van der Elst, J., Heytens, E., Van den Broecke, R., Gerris, J., Dhont, M., Cuvelier, C., and De Sutter, P. (2008). Back muscle as a promising site for ovarian tissue transplantation, an animal model. Hum Reprod 23, 619-626.

Soleimani, R., Heytens, E., Van den Broecke, R., Rottiers, I., Dhont, M., Cuvelier, C. A., and De Sutter, P. (2010). Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue into murine back muscle. Hum Reprod 25, 1458-1470.

Souquet, B., Tourpin, S., Messiaen, S., Moison, D., Habert, R., and Livera, G. (2012). Nodal signaling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. Endocrinology 153, 2466-2473.

Soyal, S. M., Amleh, A., and Dean, J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. Development 127, 4645-4654.

Speed, R. M. (1982). Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. Chromosoma 85, 427-437.

Stoop, H., Honecker, F., Cools, M., de Krijger, R., Bokemeyer, C., and Looijenga, L. H. (2005). Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. Hum Reprod 20, 1466-1476.

Strangeways, T. S. P., and Fell, H. B. (1926). Experimental Studies on the Differentiation of Embryonic Tissues Growing in vivo and in vitro. I: The Development of the undifferentiated limb. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 99, 340-364.

Summerton, J. E. (2007). Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. Curr Top Med Chem 7, 651-660.

Suzuki, A., Igarashi, K., Aisaki, K., Kanno, J., and Saga, Y. (2010). NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 3594-3599.

Suzuki, A. and Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. Genes Dev 22, 430-435.

Suzuki, H., Tsuda, M., Kiso, M., and Saga, Y. (2008). Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. Dev Biol 318, 133-142.

Svingen, T., and Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. Genes Dev 27, 2409-2426.

Taguchi, O., Cunha, G. R., Lawrence, W. D., and Robboy, S. J. (1984). Timing and irreversibility of Mullerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. Dev Biol 106, 394-398.

Taketo, T., Saeed, J., Manganaro, T., Takahashi, M., and Donahoe, P. K. (1993). Mullerian inhibiting substance production associated with loss of oocytes and testicular differentiation in the transplanted mouse XX gonadal primordium. Biol Reprod 49, 13-23.

Tam, P. P., and Zhou, S. X. (1996). The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. Dev Biol 178, 124-132.

Tanaka, S. S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., and Noce, T. (2000). The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells. Genes Dev 14, 841-853.

Taylor, B. J., and Truman, J. W. (1992). Commitment of abdominal neuroblasts in Drosophila to a male or female fate is dependent on genes of the sex-determining hierarchy. Development 114, 625-642.

Taylor, T. H., Gitlin, S. A., Patrick, J. L., Crain, J. L., Wilson, J. M., and Griffin, D. K. (2014). The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. Hum Reprod Update 20, 571-581.

Tedesco, M., La Sala, G., Barbagallo, F., De Felici, M., and Farini, D. (2009). STRA8 shuttles between nucleus and cytoplasm and displays transcriptional activity. J Biol Chem 284, 35781-35793.

Telfer, E. E., McLaughlin, M., Ding, C., and Thong, K. J. (2008). A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. Hum Reprod 23, 1151-1158.

Tevosian, S. G., Albrecht, K. H., Crispino, J. D., Fujiwara, Y., Eicher, E. M., and Orkin, S. H. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. Development 129, 4627-4634.

Thompson, J. N., Howell, J. M., and Pitt, G. A. (1964). Vitamin A and reproduction in rats. Proc R Soc Lond B Biol Sci 159, 510-535.

Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., Yoshitome, A., Yamawaki, K., Amagai, M., Inoue, A., Oshima, T., and Kakitani, M. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. Hum Mol Genet 17, 1278-1291.

Trautmann, E., Guerquin, M. J., Duquenne, C., Lahaye, J. B., Habert, R., and Livera, G. (2008). Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. Cell Cycle 7, 656-664.

Tremblay, K. D., Dunn, N. R., and Robertson, E. J. (2001). Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. Development 128, 3609-3621.

Trombly, D. J., Woodruff, T. K., and Mayo, K. E. (2009). Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. Endocrinology 150, 1014-1024.

Trowell, O. A. (1959). The culture of mature organs in a synthetic medium. Exp Cell Res 16, 118-147.

Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., and Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. Science 301, 1239-1241.

Tu, J., Fan, L., Tao, K., Zhu, W., Li, J., and Lu, G. (2007). Stem cell factor affects fate determination of human gonocytes in vitro. Reproduction 134, 757-765.

Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A. C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N. I., Riethmacher, D., Schutz, G., Cooney, A. J., Lovell-Badge, R., and Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. Cell 139, 1130-1142.

Ungewitter, E. K., and Yao, H. H. (2013). How to make a gonad: cellular mechanisms governing formation of the testes and ovaries. Sex Dev 7, 7-20.

Upadhyay, S., and Zamboni, L. (1982). Ectopic germ cells: natural model for the study of germ cell sexual differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 79, 6584-6588.

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

Van Langendonckt, A., Romeu, L., Ambroise, J., Amorim, C., Bearzatto, B., Gala, J. L., Donnez, J., and Dolmans, M. M. (2014). Gene expression in human ovarian tissue after xenografting. Mol Hum Reprod 20, 514-525.

van Pelt, A. M., and de Rooij, D. G. (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. Endocrinology 128, 697-704.

Veitia, R. A., Salas-Cortes, L., Ottolenghi, C., Pailhoux, E., Cotinot, C., and Fellous, M. (2001). Testis determination in mammals: more questions than answers. Mol Cell Endocrinol 179, 3-16.

Vergouwen, R. P., Jacobs, S. G., Huiskamp, R., Davids, J. A., and de Rooij, D. G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. J Reprod Fertil 93, 233-243.

Vidal, V. P., Chaboissier, M. C., de Rooij, D. G., and Schedl, A. (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. Nat Genet 28, 216-217.

Villella, A., and Hall, J. C. (1996). Courtship anomalies caused by doublesex mutations in Drosophila melanogaster. Genetics 143, 331-344.

Vitt, U. A., McGee, E. A., Hayashi, M., and Hsueh, A. J. (2000). In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. Endocrinology 141, 3814-3820.

Volff, J. N., Zarkower, D., Bardwell, V. J., and Schartl, M. (2003). Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. J Mol Evol 57 Suppl 1, S241-S249.

Vulpian, M. A. (1859). Note sur les phénomènes de développement qui se manifestent dans la queue des très-jeunes embryons de grenouille, après qu'on l'a séparée du corps par une section transversale. CR Acad. Sci.(Paris) 48, 807-811.

Wainwright, E. N., and Wilhelm, D. (2010). The game plan: cellular and molecular mechanisms of mammalian testis development. Curr Top Dev Biol 90, 231-262.

Walker, B. E., and Kurth, L. A. (1995). Multi-generational carcinogenesis from diethylstilbestrol investigated by blastocyst transfers in mice. Int J Cancer 61, 249-252.

Wang, X., Catt, S., Pangestu, M., and Temple-Smith, P. (2011). Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. Reproduction 141, 183-191.

Wartenberg, H. (1978). Human testicular development and the role of the mesonephros in the origin of a dual Sertoli cell system. Andrologia 10, 1-21.

Waterbury, J. A., Jackson, L. L., and Schedl, P. (1999). Analysis of the doublesex female protein in Drosophila melanogaster: role on sexual differentiation and behavior and dependence on intersex. Genetics 152, 1653-1667.

Weber, S., Eckert, D., Nettersheim, D., Gillis, A. J., Schafer, S., Kuckenberg, P., Ehlermann, J., Werling, U., Biermann, K., Looijenga, L. H., and Schorle, H. (2010). Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance. Biol Reprod 82, 214-223.

Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2003). dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. Curr Biol 13, 1429-1434.

Weissman, A., Gotlieb, L., Colgan, T., Jurisicova, A., Greenblatt, E. M., and Casper, R. F. (1999). Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. Biol Reprod 60, 1462-1467.

Wermann, H., Stoop, H., Gillis, A. J., Honecker, F., van Gurp, R. J., Ammerpohl, O., Richter, J., Oosterhuis, J. W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L. H. (2010). Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. J Pathol 221, 433-442.

West, F. D., Machacek, D. W., Boyd, N. L., Pandiyan, K., Robbins, K. R., and Stice, S. L. (2008). Enrichment and differentiation of human germ-like cells mediated by feeder cells and basic fibroblast growth factor signaling. Stem Cells 26, 2768-2776.

Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J. A., and Sinclair, A. H. (1999). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. Dev Dyn 216, 411-419.

Western, P. S., Miles, D. C., van den Bergen, J. A., Burton, M., and Sinclair, A. H. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. Stem Cells 26, 339-347.

Western, P. S., Ralli, R. A., Wakeling, S. I., Lo, C., van den Bergen, J. A., Miles, D. C., and Sinclair, A. H. (2011). Mitotic arrest in teratoma susceptible fetal male germ cells. PLoS One 6, e20736.

White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., and Parker, M. G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology 135, 175-182.

White, Y. A., Woods, D. C., Takai, Y., Ishihara, O., Seki, H., and Tilly, J. L. (2012). Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. Nat Med 18, 413-421.

Wijgerde, M., Ooms, M., Hoogerbrugge, J. W., and Grootegoed, J. A. (2005). Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells. Endocrinology 146, 3558-3566.

Witschi, E. (1948). Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. Contrib Embryol 32, 67-80.

Wolff, E., and Haffen, K. (1952). Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro. Texas Reports on Biology and Medicine 10, 463-472.

Wolff, E., Haffen, K., Kieny, M., and Wolff, E. (1953). Essais de cultures in vitro d'organes embryonnaires en milieux synthetiques. Journal of Embryology and Experimental Morphology 1, 55-84.

Wu, D., Lei, Y., Tong, Y., Tang, F., Qian, Y., and Zhou, Y. (2010). Angiogenesis of the frozen-thawed human fetal ovarian tissue at the early stage after xenotransplantation and the positive effect of Salviae miltiorrhizae. Anat Rec (Hoboken) 293, 2154-2162.

Wu, Q., Kanata, K., Saba, R., Deng, C. X., Hamada, H., and Saga, Y. (2013). Nodal/activin signaling promotes male germ cell fate and suppresses female programming in somatic cells. Development 140, 291-300.

Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohinata, Y., Seki, Y., and Saitou, M. (2006). Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. Biol Reprod 75, 705-716.

Yamaguchi, S., Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Nanog expression in mouse germ cell development. Gene Expr Patterns 5, 639-646.

Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nat Genet 40, 1016-1022.

Yang, H. Y., Cox, S. L., Jenkin, G., Findlay, J., Trounson, A., and Shaw, J. (2006). Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. Reproduction 131, 851-859.

Yao, H. H., Whoriskey, W., and Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. Genes Dev 16, 1433-1440.

Yao, H. H., Matzuk, M. M., Jorgez, C. J., Menke, D. B., Page, D. C., Swain, A., and Capel, B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. Dev Dyn 230, 210-215.

Yi, W., Ross, J. M., and Zarkower, D. (2000). Mab-3 is a direct tra-1 target gene regulating diverse aspects of C. elegans male sexual development and behavior. Development 127, 4469-4480.

Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A., and Zhao, G. Q. (2000). Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. Mol Endocrinol 14, 1053-1063.

Ying, Y., and Zhao, G. Q. (2001). Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. Dev Biol 232, 484-492.

Yoshimizu, T., Sugiyama, N., De Felice, M., Yeom, Y.I., Ohbo, K., Masuko, K., Obinata, M., Abe, K., Scholer, H.R., Matsui, Y.(1999). Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. Dev Growth Differ 41, 675–684

Youngren, K. K., Coveney, D., Peng, X., Bhattacharya, C., Schmidt, L. S., Nickerson, M. L., Lamb, B. T., Deng, J. M., Behringer, R. R., Capel, B., Rubin, E. M., Nadeau, J. H., and Matin, A. (2005). The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. Nature 435, 360-364.

Yu, R. N., Ito, M., Saunders, T. L., Camper, S. A., and Jameson, J. L. (1998). Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. Nat Genet 20, 353-357.

Zamboni, L., and Upadhyay, S. (1983). Germ cell differentiation in mouse adrenal glands. J Exp Zool 228, 173-193.

Zarkower, D. (2013). DMRT genes in vertebrate gametogenesis. Curr Top Dev Biol 102, 327-356.

Zhu, R., Iacovino, M., Mahen, E., Kyba, M., and Matin, A. (2011). Transcripts that associate with the RNA binding protein, DEAD-END (DND1), in embryonic stem (ES) cells. BMC Mol Biol 12, 37.

La mise en place de la lignée germinale au cours du développement constitue une des étapes fondamentales conditionnant la fertilité de l'individu adulte. Au cours des dernières décennies, le nombre croissant de couples consultant pour une aide médicale à la procréation a fait émerger l'hypothèse d'une altération des fonctions de reproduction chez l'Homme qui pourrait trouver son origine dans la perturbation du développement précoce. Dans l'ovaire fœtal, les cellules germinales s'orienteront vers la voie de l'ovogénèse, caractérisée entre autres par l'entrée en méiose de ces cellules. La majorité des données actuelles relatives à ces évènements sont issues du modèle murin alors que le développement de l'ovaire humain est significativement diffèrent de celui de la souris. Il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances du développement ovarien humain et d'identifier ses éventuelles perturbations. L'objectif de mon travail a été de mettre au point un outil d'étude du développement ovarien et d'identifier de nouvelles voies impliquées dans la régulation de l'entrée en méiose des cellules germinales fœtales humaines et leurs perturbations éventuelles.

Nous avons mis au point un nouveau modèle de xénogreffe d'ovaires fœtaux humains du premier trimestre de gestation (au moment de l'apparition des premières cellules méiotiques). Ce modèle nous a permis d'observer un développement de l'organe et une différenciation des cellules germinales similaires à ceux observés *in vivo*. Ce modèle permettra des travaux à des âges auxquels le matériel d'étude est peu accessible. En couplant ce modèle de xénogreffe à une stratégie d'ARN-interférence, il nous a été possible d'inhiber l'expression d'un gène spécifiquement exprimé dans les cellules germinales ovariennes, *DMRTA2,* et de mettre en évidence un potentiel rôle de ce gène dans leur différenciation pré-méiotique. Nous avons observé une diminution du nombre de cellules ayant initié la méiose après inhibition de l'expression de ce gène. Par ailleurs, nous avons également identifié la présence dans l'ovaire fœtal de nombreux marqueurs décrits comme testiculaires chez la souris (*PLZF*, *DNMT3L*, *FGF9*, *NANOS2* ou *CYP26B1)*. L'expression de ces marqueurs pourrait expliquer la présence de cellules mitotiques tardives dans l'ovaire fœtal humain que nous avons pu observer jusqu'à 30 semaines de gestation.

En parallèle de ces travaux, nous avons testé la sensibilité des cellules germinales à la dexaméthasone, glucocorticoïde pouvant être administré au cours de la grossesse. Il a été observé une augmentation de l'expression de *PLZF*, gène cible de l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes, pouvant expliquer la diminution du nombre de cellules germinales.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'identifier un nouveau gène potentiellement régulateur de la transition mitose/méiose dans l'ovaire humain, et d'affiner nos connaissances sur le développement de l'ovaire humain et l'entrée en méiose des cellules germinales. Toutefois, de nombreuses questions restent posées ainsi de futures études devront clarifier si les cellules germinales mitotiques observées à des stades tardifs sont capables de se différencier en ovocytes compétents.

Mots clés : développement, ovaire humain, cellules germinales fœtales, méiose, xénogreffe, Doublesex and Mab Related Transcription factor, dexaméthasone.