



HAL
open science

Rôle de NR5A1 dans le destin des cellules de Sertoli foetales chez la souris

Sirine Souali-Crespo

► **To cite this version:**

Sirine Souali-Crespo. Rôle de NR5A1 dans le destin des cellules de Sertoli foetales chez la souris. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ105 . tel-03703683

HAL Id: tel-03703683

<https://theses.hal.science/tel-03703683v1>

Submitted on 24 Jun 2022

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED414)
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)

THÈSE présentée par :

Sirine SOUALI-CRESPO

Soutenue le : vendredi 8 janvier 2021

En vue de l'obtention du grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Rôle de NR5A1 dans le destin des cellules de Sertoli foetales chez la souris

THÈSE dirigée par :

Dr. GHYSELINCK Norbert

DR, CNRS, IGBMC, Strasbourg

Pr. MARK Manuel

PU-PH, UNISTRA, IGBMC, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. BOIZET-BONHOURE Brigitte

DR, CNRS, IGH, Montpellier

Pr. LEFRANCOIS-MARTINEZ Anne-Marie

PU, UCA, GReD, Clermont-Ferrand

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. CERALINE Jocelyn

MCU-PH, UNISTRA, IGBMC, Strasbourg

Dr. COTINOT Corinne

DR, INRA, BREED, Jouy en Josas

*« la vie est un apprentissage qui ne finit jamais »
Youssoupha*

*« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. Rien dans la vie n'est
à craindre, tout doit être compris. C'est maintenant le moment de comprendre
davantage, afin de craindre moins. »
Marie Curie*

A l'Abuela Mica

Remerciements

Pour commencer je souhaite remercier : Dr. Brigitte Boizet, Dr. Jocelyn Ceraline, Dr. Corinne Cotinot et Pr. Marie Lefrancois-Martinez d'avoir accepté de me faire l'honneur d'être les membres de mon jury. Je tiens à vous remercier sincèrement d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail. Je souhaite aussi remercier le Dr. Pierre Antony et le Pr. Marie Lefrancois-Martinez d'avoir suivi l'évolution de mes travaux à travers mes comités de mi-thèse. Je vous remercie pour vos conseils bienveillants et vos remarques constructives.

Mes remerciements vont ensuite naturellement à mon équipe et tout particulièrement au Docteur Norbert Ghyselinck et au Pr. Manuel Mark. Je vous remercie de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma thèse dans votre équipe. Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Norbert Ghyselinck qui m'a encadré durant ces 4 années. Je vous remercie pour vos conseils, votre patience (je pense que parfois il en fallait beaucoup...) et votre disponibilité constante. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que j'ai appris à vos côtés. Je veux aussi vous remercier pour votre soutien lors de mes nombreux moments de doute notamment durant la rédaction de ce manuscrit. J'espère que la rigueur scientifique et l'enthousiasme pour la recherche que vous m'avez transmis ne me quitteront pas. Merci aussi au Pr. Manuel Mark pour vos remarques toujours exactes et précises. J'ai appris énormément grâce à votre patience et votre grand sens du détail (surtout lors des longues journées de dissections). Sachez enfin que je suis consciente de la chance que j'ai eu de réaliser ma thèse dans votre équipe.

Je souhaite remercier le reste de l'équipe sans qui ces années de thèses n'auraient pas été les mêmes ! Betty, Diana, Nadège, Marius et Muriel. Betty, merci pour ces journées « RNAseq » en binôme, sans toi je n'aurai jamais réussi à réaliser cette manip ! Merci aussi pour les PCR de la dernière chance. Nadège merci pour nos discussions, ta disponibilité et tes nombreux encouragements. Je n'oublierai jamais les piaillements de l'armoire à 37°C ! Muriel, je te remercie pour le temps que tu as passé au microtome pour ce projet. Marius, ta bonne humeur et ton enthousiasme sont communicatifs ! J'ai adoré t'entendre distiller tes petites anecdotes durant ces 4 années. Merci et j'espère que tu ne m'en veux pas pour toutes les propositions de footings que j'ai refusés.

Diana, mon rayon de soleil ! Je regrette que nous n'ayons pas pu partager plus d'années de thèse dos à dos ! J'admire ta douceur, ta gentillesse, ton courage et ton talent. Ta présence durant cette dernière année a embelli mon quotidien. Merci pour ton aide, tes conseils, ton écoute et ton amitié. Nos discussions, ton rire après mes « Punaise, j'ai encore oublié le DAPI ! », nos déjeuners et encore bien d'autres choses qu'on a pu partager vont beaucoup me manquer. Je te souhaite le meilleur et beaucoup de réussites pour ta thèse.

Que seraient nos thèses à l'IGBMC sans l'esprit d'entraide qui y règne ? Mon projet de thèse aurait été très différent sans l'aide des personnes passionnées et pleines de ressources qui y travaillent soit au sein des équipes de recherche ou des plateformes.

Merci aux membres de la plateforme d'histologie, Olivia, Hugues, Déborah, Bruno, Patrice et Leila. Merci de ne jamais avoir dit que vous en aviez marre de mes demandes de déparaffinages incessantes. Merci pour vos conseils techniques et votre accueil toujours souriant.

Merci aux membres de la plateforme de microscopie Elvire, Bertrand et Erwan pour qui rien n'est impossible à imager. Je savais qu'à chaque passage au premier étage j'allais repartir avec le sourire. Merci particulièrement à Erwan pour son immense patience même après mon quinzième appel au secours de type « Je sais que tu m'as déjà expliqué mais j'ai oublié où je dois appuyer pour allumer la machine ! ». Ton aide au microscope et tes macros m'ont fait gagner un temps inestimable. Mais, ce que je retiendrais surtout c'est ton optimisme, ta générosité et ta bienveillance (ton miel et les pauses café aussi évidemment !).

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Jean-Luc PLASSAT, vous avez été d'une pédagogie rare pour m'enseigner l'art de la RT-qPCR « one step ». Sans votre aide je serais encore en train de disséquer des embryons ! Dans cette période de grand stress, votre calme et votre gentillesse m'ont beaucoup aidé.

Merci à toutes les personnes de l'animalerie conventionnelle qui ont pris soin de mes souris. L'animalerie... j'y allais à reculons plus d'une fois mais les sourires (même à travers le masque) et la bonne humeur de Martine, Alexandre et William ont rendu ces moments beaucoup plus agréables. Merci à vous.

Un grand merci aux membres de la plateforme Genomeast. C'est en partie grâce à vous que j'ai obtenu les données de single cell RNA-seq. Merci à Christelle, Violaine, Marie pour leur aide précieuse, leur réactivité et leur sérieux pendant la mise au point de cette expérience. Merci à Doulaye pour le temps que vous m'avez accordé, grâce à vous j'ai repris goût aux

statistiques. Matthieu merci pour ta patience et ta disponibilité lors de l'analyse des données. Merci pour tes réponses claires et simples à la novice totale en bioinfo que j'étais.

Merci Aurélie Auburtin pour ta réactivité et ton aide dans la lecture des plaques. Tu rayannes par ton dynamisme et ton énergie toujours positive !

Merci Régis Lutzing pour ces journées de formation Western-blot avec pause-café ! Merci à Delphine Duteil pour ses encouragements et ses conseils durant les deux jours que nous avons passés ensemble en congrès. Je tiens à remercier plus globalement toute l'équipe Metzger pour leur nombreux dons d'anticorps et le temps qu'ils m'ont accordé.

Juliette Godin, merci d'avoir pris le temps de me conseiller quand j'étais perdue avec mes centrosomes.

La thèse c'est du travail mais c'est aussi des superbes rencontres et des moments conviviaux.

Je souhaite remercier mon équipe d'adoption les Chelly-Pitton-Moine ! Les déjeuners du 3^e avec Jeremie, Johan, Amélie, Peggy, Vicky, Gaby, Paul, Sarah, Bogi, Nathalie, Oktay, Pierre, Laure, Ekat, Helin, Angeliki, Diana et Karima. Ces moments de partages et de rires ont grandement contribué à mon bonheur durant ces 4 années. Merci à tous !

Je voudrais remercier chaleureusement le Pr. Jamel Chelly. Ma présence (peut-être un peu trop régulière) au 3^e étage m'a permis de vous rencontrer. Sachez que lors de nos échanges, votre bienveillance, votre sagesse et vos conseils m'ont beaucoup inspiré.

Merci aussi à tous mes voisins Phd de l'équipe Herault. Vos invitations « au goûter » de 19h ! Je n'ai pas maigri grâce à vous mais j'ai été beaucoup plus heureuse ! Mar, merci à toi pour toutes nos discussions, ton aide précieuse et tes encouragements. Tu as ramené la chaleur espagnole dont j'avais besoin plus d'une fois. Muchas gracias guapa !

A mes stagiaires préférés, Pierre et Oktay, vous avez été comme un vent d'air frais ! Vous m'avez remonté le morale un nombre de fois incalculables, parfois même sans le savoir. Merci pour toutes ces soirées deliveroo après les longues journées de manip. Pierre, merci pour le tapis il parle encore régulièrement de toi.

Gaby, je te remercie pour ton aide pendant la rédaction de ce manuscrit, tes conseils m'ont beaucoup aidé. Merci pour ta bienveillance et ton dynamisme communicatif.

Ma thèse a été marqué par la rencontre avec de jeunes femmes douées, intelligentes et passionnées par « la science et la vérité » (La révolution) ! Laure, Ekat, Diana, Helin, Angeliki et Karima. Vous avez été les meilleures partenaires de pause qu'on peut espérer avoir ! Vous

avez été le cocon dans lequel j'ai trouvé du réconfort dans les moments compliqués mais aussi, celui dans lequel j'ai aimé fêter chaque événement heureux. Vous êtes des jeunes femmes magnifiques, vous m'avez toutes, à votre manière, inspiré et aidé à en arriver là aujourd'hui, merci.

Laure merci pour ton humour, ton énergie débordante et tes conseils. Surtout, merci de m'avoir caché aussi longtemps que tu faisais du sport 2 fois par semaine à 7h du matin. Ekaterina, tu as été ma première partenaire de café. Grâce à toi je me suis sentie moins seule à mon arrivée. Ces moments OFF m'ont permis de tenir le coup durant les journées difficiles. Je me souviendrais longtemps de nos discussions et de ta générosité. Merci pour tout ! Helin, ton énergie, ta motivation et ta persévérance face aux difficultés sont admirables. Une vraie pile électrique qui m'a transmis son énergie plus d'une fois. Merci pour ces nombreux trajets en tram que tu m'as évité, tes encouragements, nos pauses encore beaucoup d'autres moments. C'était une chance de t'avoir juste à côté de moi. Angeliki, la diva d'Athènes ! Nous venons de fêter nos un an pour mon plus grand bonheur. Merci pour ton soutien, tes messages, ta gentillesse. Plus d'une fois tu as su me rassurer dans mes gros moments de doutes/angoisses. Maláka ! nos pauses vont me manquer !

Karima, mon pilier, ai-je besoin de revenir encore une fois sur tout ce que nous avons vécu ensemble ? Évidemment que je vais le faire ! Tout a commencé à la maternelle de la Brigitte à Hautepierre il y a une bonne vingtaine d'années. Depuis, nous avons vécu la licence, le master et enfin la thèse. Les journées de révisions interminables avec l'équipe de choc, les réveils à l'aube les jours de partiel, le deal de fiches de révisions, Corneille dans la voiture... J'ai souvent douté de moi et de mes capacités pour réussir ces études, mais toi non. Tu as toujours cru en moi beaucoup plus que moi-même. Durant cette thèse, dans les mauvais comme dans les bons moments, savoir que tu étais juste au-dessus de ma tête a été un réconfort essentiel. Je suis chanceuse d'avoir partagé les années les plus formatrices de ma vie avec la jeune femme entière, juste, bienveillante, inspirante, patiente et sage que tu es. Je m'excuse pour toutes les fois où j'ai râlé sans m'arrêter (on se ne refait pas...) et que tu as su me réconforter. J'espère avoir acquis au moins un peu de ta sagesse durant ces années. Je voudrais aussi remercier affectueusement tes formidables parents qui ont toujours eu une pensée, un mot pour moi et ma famille.

Quand je réfléchis aux rencontres qui ont changé ma vie, je ne peux m'empêcher de penser au Pr. Becker. Merci à vous de m'avoir donné ma chance en m'acceptant dans votre

master. Je n'avais pas le meilleur dossier mais vous avez cru en moi. C'est grâce à vous et ce master que je me suis forgée la certitude d'avoir fait le bon choix en optant pour ce parcours.

Durant ma thèse, j'ai passé beaucoup de temps au labo mais durant mon temps libre j'avais la chance d'avoir une famille et des amis magnifiques pour me changer les idées.

A tous mes amis, merci pour ces soirées de Noël, d'halloween, d'anniversaire, apéro, diners... Vous êtes trop nombreux pour tous vous citer alors je ferai un énorme merci général ! Promis à partir du 8 janvier je ne refuserai plus jamais une invitation ! Que la fête commence !

Marie L. merci pour les doux messages et encouragements quotidiens. Ces petites fenêtres sur la vie réelle m'ont permis de m'évader durant la rédaction de ce manuscrit. Merci pour ton altruisme et ta générosité. Caroline, merci pour tes encouragements et ton soutien. Ces dernières années n'ont pas toujours été faciles mais je suis certaine que le meilleur est à venir. Dans les mauvais comme dans les bons moments l'important c'est d'être ensemble.

Je voudrais aussi remercier tendrement mes sœurs de cœur, Emma et Marie. Depuis bientôt 10 ans vous rendez ma vie plus belle, il m'est impossible d'imaginer où j'en serai sans vous. Vos messages, vos appels, vos colis (mon dieu vos colis !!!), nos diners, nos soirées... Je voudrais aussi remercier Quentin et Mounir qui ont beaucoup de mérite de nous supporter... Je remercie aussi affectueusement vos parents, Christine, René, Bernard et Marie-Catherine pour leurs encouragements et leur bienveillance. Merci à Bernard et Marie-Catherine pour les journées de vacances à La Wantzenau. Emma, d'abord merci d'avoir fait de nous les heureuses tatas du petit Iklil depuis presque un an. Merci de m'avoir si souvent transmis ta douceur et ta patience dans mes moments de stress incontrôlables. Marie, quand je pense à toi, j'entends ton rire et je vois ton sourire. Après 10 min avec toi j'oublie automatiquement tous mes tracas ! Merci de m'avoir si souvent changé les idées. Promis, après le 8 janvier, je ne vous saoulerai plus avec ma thèse et mes souris !!! Durant ces 10 années, nous avons vécu des épreuves et des grands moments de joie qui nous ont soudés pour toujours. Je ne peux pas imaginer avoir meilleures amies que vous. J'espère, un jour, pouvoir vous rendre tout l'amour et le soutien que vous me donnez. Je vous aime.

A ma famille dont les membres sont trop nombreux pour que je les cite tous personnellement. C'est avec beaucoup d'émotions que je regarde en arrière et mesure la chance que j'ai eu de tous vous avoir. Vous n'avez pas toujours très bien compris ce que je faisais mais vous m'avez toujours soutenu et couvert de votre amour, merci pour ça. Merci à tous les Souali, mes tantes, mes oncles, mes cousins et surtout à Papi Amar et Mami Safia pour leur

soutien et leur affection. Merci aussi aux Crespo, nos diners, nos vacances, nos conversations whatsapp ! Vos messages à n'importe quelle heure du jour et de la nuit, les 2039 notifications en 2 heures. Merci pour ces énormes fous rires et ces moments de partages à mes oncles, mes tantes, mes cousins et Abuelo.

Enfin, mes plus grands remerciements vont à mes parents et ma sœur. Sania, grâce à toi je suis une grande sœur comblée. Je suis fière de tes combats, tes convictions et de la jeune femme indépendante et forte que tu es devenue. Tu as décidé de donner ton temps et ton énergie à ceux qui en ont besoin, je t'admire pour ça. Papa, Maman, vous m'avez toujours encouragé pourtant dès le collège c'était plutôt mal parti... Mais jamais vous n'avez douté de moi. Vous m'avez donné tout ce dont j'avais besoin et plus encore pour réaliser mes rêves. Je n'aurai jamais les mots pour exprimer combien je vous suis reconnaissante. Je m'excuse pour tout le souci et le stress que je vous ai fait durant ces 10 longues années d'études. Papa, merci pour ta douceur, ta tendresse et tes petits plats si réconfortant durant ma rédaction. Merci aussi de m'avoir remis les pieds sur terre et fait relativiser dans mes grands moments de doutes. Maman, merci pour tes encouragements, ton aide, ta fameuse lumière et ton amour débordant. Surtout, merci pour les sacrifices que tu as fait pour que Sania et moi puissions devenir les jeunes adultes heureuses et épanouies que nous sommes. A quatre, nous avons réussi à transformer les épreuves en force. Cette thèse est aussi la vôtre. Merci.

Mes derniers remerciements seront pour Abuela, récemment tu as laissé derrière toi une famille unie et pleine d'amour que tu as façonnée. J'espère un jour devenir la femme courageuse, sage et aimante que tu as été pour nous tous. Cette thèse t'est dédiée.

Table des matières

Remerciements	1
Liste des figures	10
Liste des abréviations	12
Préambule	19
Chapitre I : Le développement de la gonade	21
1. La formation des crêtes génitales (de la gonade bipotentielle)	21
1.1 Formation des crêtes génitales et leur devenir	21
A. <i>Gata4</i> (GATA-binding protein 4)	21
B. <i>Wt1</i> (Wilm's tumor suppressor 1)	22
C. <i>Lhx9</i> (LIM homeobox9)	23
D. <i>Insr</i> (insulin receptor) et <i>Igf1r</i> (insulin-like growth factor 1 receptor)	24
E. <i>Six1/4</i> (sine oculis-related homeobox 1/4).....	24
F. <i>Emx2</i> (empty spiracles homeobox 2)	25
G. <i>Nr5a1</i> (steroidogenic factor 1).....	25
1.2 Les cellules germinales primordiales (CGP).....	29
A. La spécification.....	29
B. La migration	32
C. La colonisation.....	33
2 Développement de la gonade	37
2.1. Le testicule fœtal : Différenciation des cellules somatiques	37
A. Les cellules de Sertoli	37
a. Sry (Sex-determining Region of Y chromosome).....	37
b. SOX9 (SRY-Box Transcription Factor 9)	43
c. Autres membres de la famille des Sox	50
d. Dmrt1(Dsx and Mab-3-related Transcription factor 1)	52
e. Amh (Anti-Müllerian Hormone).....	53
f. Dhh (Desert hedgehog).....	54
g. <i>Wt1</i> (Wilm's tumor suppressor 1)	55
h. <i>Nr5a1</i> (steroidogenic factor 1).....	56
B. Les cellules de Leydig fœtales / adultes	59
C. Les cellules myoïdes péritubulaires	66
2.2. Le testicule fœtal : Différenciation des cellules germinales.....	67
2.3. L'ovaire : Régulation génétique du développement ovarien.....	75
A. La voie Wnt/ β -caténine et ses activateurs <i>Wnt4</i> et <i>Rspo1</i>	75
B. β -caténine, effecteur de la voie Wnt/ β -caténine	79
C. <i>Foxl2</i> (Forkhead box-L2)	81
2.4. L'origine commune des cellules somatiques du testicule et de l'ovaire	83
2.5. Maintien de l'identité sexuelle.....	87
Chapitre II : Le développement du tractus urogénital mâle et femelle	91
1. L'anatomie du tractus urogénital mâle et femelle	91
2. AMH et ses récepteurs	93
3. La Testostérone et la Dihydrotestostérone	99
4. La mise en place de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire	105
Chapitre III : Le récepteur nucléaire NR5A1	107
1. Généralités sur les récepteurs nucléaires	107
1.1 Le domaine A/B ou NTD	107

1.2	Le domaine C ou DBD.....	109
1.3	Le domaine D ou région charnière.....	109
1.4	Le domaine E ou LBD.....	111
1.5	Le domaine F.....	111
2.	NR5A1.....	113
2.1	Structure.....	113
2.2	Ligands hypothétiques.....	115
2.3	Mode d'action de NR5A1 et ses corégulateurs.....	117
2.4	Processus biologiques et pathologies impliquant <i>Nr5a1</i>	119
A.	La stéroïdogénèse.....	119
B.	L'ovaire.....	123
C.	Développement neuronal.....	123
D.	L'endométriose.....	124
E.	Cancer.....	124
F.	Troubles du développement sexuel.....	125
	Objectifs.....	128
	Chapitre IV : Résultats.....	131
	Chapitre V : Discussion.....	171
1.	Ablation de <i>Nr5a1</i> dans les cellules de Sertoli.....	171
2.	Perte de la fonction Sertolienne.....	173
3.	Quel avenir pour les cellules germinales sans cellules de Sertoli fonctionnelles ?.....	177
4.	Le changement d'identité des cellules de Sertoli en l'absence de <i>Nr5a1</i>	179
5.	Les causes de la disparition des cellules de Sertoli.....	183
6.	Les cellules de Leydig sont-elles impactées par la disparition des cellules de Sertoli ? ..	187
7.	L'hermaphrodisme des mutants <i>Nr5a1</i> ^{SC-/-} était-il prévisible ?.....	188
8.	<i>Nr5a1</i> joue-t-il un rôle dans l'homéostasie des centrosomes dans les cellules de Sertoli ?	193
9.	L'invalidation de <i>Nr5a1</i> dans les cellules de Sertoli après la naissance.....	195
10.	Conclusion (Figure 42).....	199
	Conclusion générale :.....	200
	BIBLIOGRAPHIE :.....	202

Liste des figures

Figure 1 : Le développement des crêtes génitales

Table 1 : Gènes participants à la formation des crêtes génitales et le phénotype induit par leur invalidation

Figure 2 : Schéma du réseau moléculaire qui régule la formation et le développement des précurseurs gonadiques NR5A1-positifs

Figure 3 : Chronologie du développement des cellules germinales progénitrices

Figure 4 : Dynamique d'apparition et de différenciation des cellules somatiques à partir des mêmes précurseurs cellulaires lors de la détermination du sexe

Table 2 : Gènes exprimés par les cellules de Sertoli et participants à la différenciation testiculaire

Figure 5 : Modèle de la régulation positive de *Sry*

Figure 6 : Modèle d'action de KDM3A pour réguler l'expression de *Sry* chez la souris

Figure 7 : Localisation des sites potentiels de liaison des facteurs de transcription dans *Enh13* à travers l'évolution.

Figure 8 : Modèle moléculaire des interactions géniques dans le développement du testicule.

Figure 9 : Modèles proposés pour le développement des cellules de Leydig.

Figure 10 : Modèles proposés pour l'initiation de la méiose.

Figure 11 : Modèles proposés pour l'initiation de la méiose par une substance initiatrice de méiose

Figure 12 : Étapes chronologiques de la méiose chez le mâle.

Figure 13 : Schéma de l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine par WNT4 et RSPO1

Figure 14 : Les voies de signalisation antagonistes mâle et femelle

Figure 15 : Dynamique d'apparition et de différenciation des cellules somatiques à partir des mêmes précurseurs cellulaires lors de la détermination du sexe

Figure 16 : Modèle du réseau génétique antagoniste entre les gènes régulant la différenciation testiculaire et ovarienne

Figure 17 : Différenciation du tractus urogénital mâle et femelle

Figure 18 : Visualisation de la régression des canaux de Müller à 15,00jpc grâce à l'expression rapporteur LacZ exprimé sous le contrôle de *Lim1* (LIM homeobox 1)

Figure 19 : Modèle pour l'activation de la voie de signalisation des Smads par AMH

Figure 20 : Modèle proposé du réseau moléculaire qui régule la régression des canaux de Müller sous l'influence de l'expression d'*Amh*

Table 3 : Gènes impliqués dans la régression des canaux de Müller et phénotypes observés lors de leurs invalidations respectives

Figure 21 : Voie de la synthèse des stéroïdes sexuels

Figure 22 : Schéma de la masculinisation de l'épididyme et de la prostate en réponse aux androgènes

Figure 23 : Schéma représentant les défauts de signalisation des androgènes

Figure 24 : Mode d'action proposé de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en réponse aux androgènes

Figure 25 : L'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire

Figure 26 : Arbre phylogénique des récepteurs nucléaires

Figure 27 : Schéma général de la structure des récepteurs nucléaires et leurs domaines

Figure 28 : Liaison des récepteurs nucléaires aux éléments de réponse HRE (Hormone-Response Element)

Figure 29 : Conservation de différentes régions de NR5A1 entre les espèces

Figure 30 : Représentation schématique de la liste non exhaustive des protéines qui interagissent avec NR5A1 pour réguler son activité transcriptionnelle

Figure 31 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NR5A1 par NR0B1

Figure 32 : Du primordium gonado-surrénalien aux glandes surrénales et aux gonades matures

Table 4 : Localisations principales dans les organes reproducteurs des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse et régulés par NR5A1

Figure 33 : Localisations des 188 mutations du gène NR5A1 chez l'homme

Figure 34 : Baisse de l'expression de *Pdgfra* dans les cellules de Sertoli invalidées pour *Nr5a1*

Figure 35 : Déséquilibre des voies de signalisation antagonistes mâle et femelle

Figure 36 : Le retour à un état précoce des cellules de Sertoli invalidée pour *Nr5a1*

Figure 37 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse après l'invalidation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli

Figure 38 : Niveau d'expression de *Mdm2* après l'invalidation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli

Figure 39 : Identification des types cellulaires exprimant *Hsd17b12*, *Hsd17b3* et *Hsd17b1* à 14,50jpc dans le testicule à partir des données transcriptomiques

Figure 40 : Méthode de comptage des cellules polynucléées ou polylobées et présentant un nombre anormal de centrosomes

Figure 41 : Échec de l'invalidation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli à l'aide de *Sox9-creERT2*

Figure 42 : Vue globale des évènements provoqués par l'invalidation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli

Liste des abréviations

a-SMA : α -Smooth Muscle
ACVR1 : Activin A receptor type 1
ADN : Acide désoxyribonucléique
AF-1/2 : Activation function 1/2
AGD : Distance anogénitale
ALDH1A1 : Retinal dehydrogenase 1
ALK : Anaplastic lymphoma kinase
AMH : Anti-Müllerian hormone
AMHR2 : Müllerian inhibiting substance receptor 2
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
APC : Adenomatous polyposis coli
AR : Androgen receptor
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARX : Aristaless related homeobox gene
ATAC-seq : Assay for transposase-accessible chromatin sequencing
ATRA : Acide tout-trans rétinolique

BAX : BCL-2 associated X protein
BLIMP1 : B-lymphocyte maturation-induced protein 1
BMP : Bone morphogenetic protein
BMPR1A : Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A
BrdU : 5'-bromo-2'-deoxyuridine

CBP : CREB binding protein
CBX2 : Chromobox protein homolog 2
CCNE 1/2 : Cycline E 1/2
CDK7 : Cyclin-dependent kinase 7
CDKN 1A/2A/1B/2B : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A/2A/1B/2B
CER1 : Cerberus 1
CG : Cellules germinales
CGP : Cellules germinales primordiales
ChiP : Chromatin immunoprecipitation
CL : Cellule de Leydig
CLA : Cellules de Leydig adultes
CLDN3 : Claudine 3
CLF : Cellules de Leydig fœtales
CMP : Cellules myoïdes périvitubulaires
COL 4A1/4A2 : Collagen alpha-1/2 (IV) chain
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CS : Cellule de Sertoli
CTE : C-terminal extension region
CTNNB1 : β -caténine 1
CXCL2 : Chemokine (CXC motif) ligand 2
CXCR 4 : GPCR chemokine (CXC motif) receptor 4
CYP 11A1/17A1/19/26B1 : Cytochrome P450 11A1/17A1/19/26B1

DAZL : Deleted in azoospermia like
DBD : DNA binding domain
DDX4 : DEAD-box helicase 4
DHH : Desert hedgehog
DHT : Dihydrotestostérone
DKK1 : Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
DKK2 : Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2
DMRT1 : Dsx and Mab-3-related transcription factor 1
DNaseI-seq : Deoxyribonuclease I hypersensitive site sequencing
DNMT 3a/3b/3l : DNA methyltransferases 3a/3b/3l
DP1 : DP receptor associated to adenylyl-cyclase and intracellular cAMP production

EC : Epithélium cœlomique
EMT : Transition épithéliomésenchymateuse
EMX : Empty spiracles homeobox É
ENH13 : Enigma homolog protein 13
ERS 1/2 : Ethylene response sensor 1/2
ES : Cellules souches embryonnaires
ESR 1/2 : Estrogen Receptor 1/2

FGF9 : Fibroblast growth factor 9
FGFR2 : Fibroblast growth factor receptor 2
FOG2 : Zinc finger protein ZFPM2
FOXL2 : Forkhead box-L2
FSH : Follicle-stimulating hormone
FST : Follistatin

GADD45g : Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 gamma
GATA 2/4 : GATA-binding protein 2/4
GEM : GTP binding protein
GJA1 : Gap junction alpha-1 protein
GLI1 : Zinc finger protein GLI1
GLP/G9a : Glucagon-like-peptide/euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2
GnRH : Gonadotropin-releasing hormone
GSK3b : Glycogen synthase kinase 3 beta

HAC : Histones acétyltransférases

Hh : Hedghog
HMG : High-mobility group
HOX a1/b1 : Homeobox protein a1/b1
HRE : Hormone-response element
HSD 3B1/17B3 : 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3B1/17B3
HTR3A : 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A

IGFLR : Insulin-like growth factor 1 receptor
IHC : Immunohistochimie
INHb : Inhibin beta
INSL3 : Insulin-like hormone 3
INSR : Insulin receptor
IP : Intrapéritonéale
ITGA6 : Integrin alpha-6

jpc : Jours post-coïtum

KDM3A : Lysine demethylase 3A
KITL : Kit ligand
KTS : Lysine, threonine, serine

LacZ : β -galactosidase
LBD : Ligand binding domain
LEF : Lymphoid enhancer factor
LGR 4/5 : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4/5
LH : Hormone lutéinisante
LHR : LH receptor
LHX9 : LIM homeobox9
LIM1 : LIM homeobox 1
LIN28B : Lin-28 homolog B
LRP 5/6 : LDL receptor-related protein 5/6

M : Mésonéphros
MAP3k4 : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MB : Membrane basale
MBF-1 : Multiprotein bridging factor
MDM2 : Murine Double Minute 2
MIS : Meiosis inducing substance
MIS : Müllerian inhibiting substance
MIWI2 : Mouse PIWI 2
MPS : Meiosis preventing substance

NANOS 2/3 : Nanos C2HC-Type Zinc Finger 2/3

NCAM : Neural cell adhesion molecule
NCOR2 : Nuclear receptor co-repressor 2
NES : Nestin
NR0B1 (ou DAX1) : Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1
NR5A1 : Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1
NTD : N-terminal domain

OSX : Osterix
OXT2 : Orthodenticle homeobox 2

pb : Paire de bases
PCS : Précurseurs des cellules somatiques de la gonade
PDGFA : Platelet-derived growth factor subunit A
PDGFA : Platelet-derived growth factor-a
PDGFRA : Platelet-derived growth factor receptor alpha
PDMS : Persistent Müllerian duct syndrome
PGD2 : Prostaglandine D2
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protein kinase C
POD1 : Podocyte expressed-1
PR1X : Pathogenesis-related protein 1X
PRDM 1/14 : PR domain zinc finger protein 1
PTCH1 : Patched 1
PTCH1 : Protein patched homolog 1
PTGDS : Prostaglandin D synthase

RAR : Retinoic acid receptor
RB1 : Retinoblastome protein 1
RN : Récepteur nucléaire
RNF31 : Ring Finger Protein 31
RNF31 : Ring finger protein 31
ROR2 : RAR-related orphan receptor 2
RSPO1 : R-Spondin 1

SCARB1 : Scavenger receptor class B, member 1
SCP2 : Sterol carrier protein-2
scRNA-seq : single cell RNA-sequencing
SDF1 : Stromal cell-derived factor 1
SF1 : Steroidogenic factor 1
SHH : Sonic hedgehog
SHP : Small heterodimer partner
SIX1/4 : Six oculis-related homeobox 1/4
SMAD 1/4/5 : Suppressor of mothers against decapentaplegic
SMOC2 : SPARC related modular calcium binding 2

SMOC2 : SPARC related modular calcium binding 2

SOAT1 : Sterol o-acyltransferase 1

SOX 2/4/8/9/10 : SRY-box transcription factor 2/9

SPATS21 : Spermatogenesis associated, serine-rich 2-like

SRD5A1 : 3-oxo-5 α - steroid 4- dehydrogenase 1

SRY : Sex-determining region of Y chromosome

STAR : Steroidogenic acute regulatory protein

STRA8 : Stimulated by retinoic acid gene 8

protein homolog **SUG** : Sinus urogénital

SYCP3 : Synaptonemal Complex Protein 3

TAF71 : Transcription initiation factor TFIID subunit 7-like

TAM : Tamoxifène

TBX 2/3 : T-box transcription factor 2/3

TCF : T-cell factor

TCF21 : Transcription factor 21

TDF : Testis-determining factor

TDRD1 : Tudor domain-containing protein 1

TDS : Troubles du développement sexuel

TES : Testis-specific enhancer of Sox9

TESCO : TES core

TFM : Testicular feminized mice

TG : Tubercule génital

TGF- β : Tumor growth factor beta

TJP1 : Tight junction protein ZO-1

TMEM184a : Transmembrane protein 184a

TRP53 : Transformation related protein 53

TSS : Transcription start site

TUBB3 : Tubulin beta-3 chain

TUBG : Tubulin gamma chain

TUNEL : Terminal deoxy-nucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling

WNT 3/4/5 : Wingless-type MMTV integration site family member 3/5

WT1 : Wilm's tumor suppressor 1

XLAG : X-linked lissencephaly with abnormal genitalia

YFP : Yellow fluorescent protein

ZN : Zinc finger

ZNRF3 : Zinc and ring finger 3

Introduction

Chapitre I

Le développement de la gonade

Préambule

Les cordons séminifères du testicule dans lesquels se déroule la spermatogenèse sont composés des cellules germinales et des cellules somatiques de soutien appelées cellules de Sertoli. Entre les cordons séminifères se trouvent d'autres cellules somatiques interstitielles, dont les cellules stéroïdogènes appelées cellules de Leydig. Durant le développement embryonnaire, les cellules de Sertoli sont les premières cellules somatiques du testicule à émerger. Leur différenciation nécessite une fine régulation spatio-temporelle de l'expression de leur programme génique. Par ailleurs, la différenciation des autres types cellulaires du testicule et, plus globalement du tractus-urogénital, dépend de signaux émanant des cellules de Sertoli. L'un des gènes exprimés par les cellules de Sertoli et essentiel au développement du testicule chez les mammifères code pour le récepteur nucléaire orphelin NR5A1, aussi appelé SF1 pour Steroidogenic Factor 1. Chez l'homme des mutations dans ce gène conduisent à des pathologies gonadiques telles que le syndrome de dysgénésie testiculaire ou des anomalies de la différenciation sexuelle.

Mes travaux visent à apporter une meilleure compréhension du rôle de NR5A1 dans les cellules de Sertoli durant le développement embryonnaire et pendant la vie post-natale, grâce à la génération de modèles de souris génétiquement modifiées.

L'introduction de ce manuscrit contextualise l'intérêt de mes travaux dans le cadre du développement du système urogénital en adéquation avec le sexe chromosomique. Pour cela, l'introduction est subdivisée en 3 chapitres. Le premier chapitre détaille les facteurs intervenant dans **le développement des gonades** à partir du primordium gonado-surrénalien. La dynamique d'apparition de chaque type cellulaire de la gonade et les travaux qui ont permis d'identifier leurs origines respectives y sont aussi présentés. Puis dans le second chapitre, je décris **le développement du tractus urogénital**, ainsi que les gènes et les hormones impliqués dans ce processus. Enfin, le dernier chapitre a pour objet **le récepteur nucléaire NR5A1**. Sa structure, son mode d'action, ses partenaires, ses rôles dans les divers organes et pathologies dans lesquels il est impliqué sont exposés.

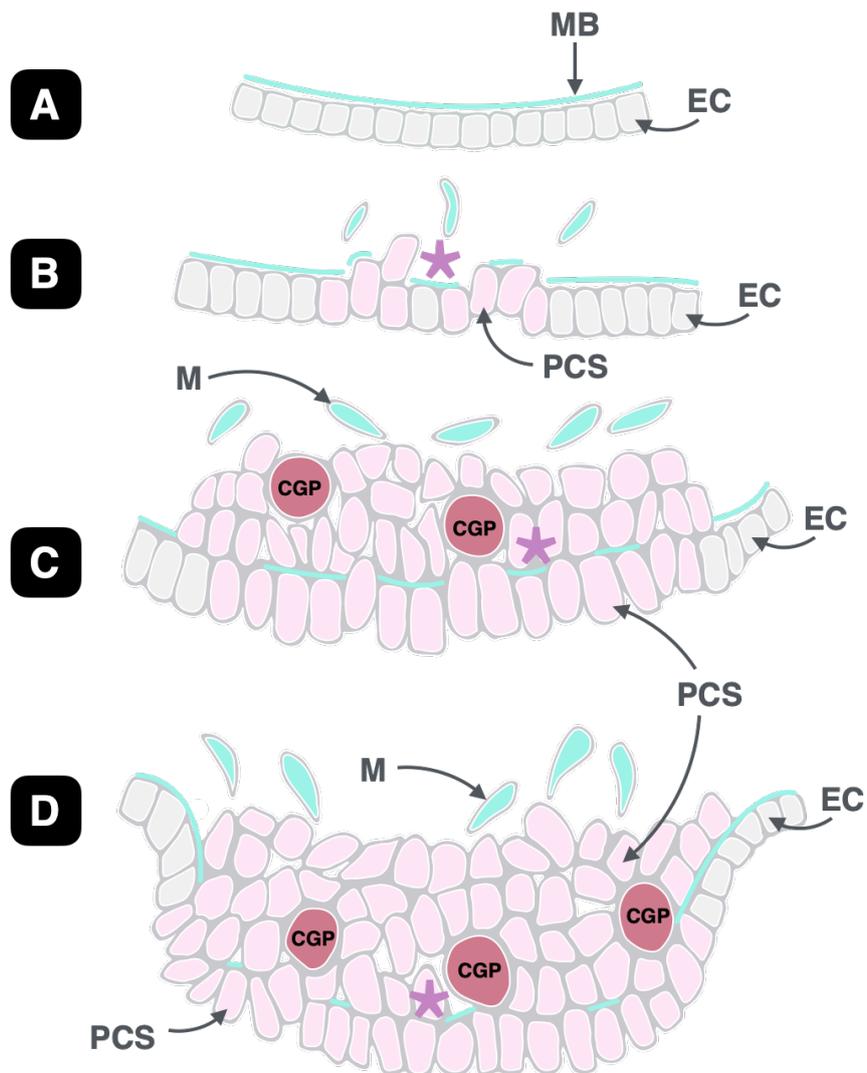


Figure 1 : Le développement des crêtes génitales

(A) L'épithélium cœlomique (EC) est monocouche et supporté par la membrane basale (MB).

(B) Certaines cellules de l'épithélium cœlomique perdent leurs caractéristiques épithéliales en réalisant leur transition appelée transition épithéliomésenchymateuse (EMT) elles se transforment alors en cellules NR5A1-positives qui sont les précurseurs des cellules somatiques de la gonade (PCS). Puis, les cellules NR5A1-positives prolifèrent et traversent la membrane basale en fragmentation (astérisque).

(C) La crête génitale précoce est formée d'un amas de cellules NR5A1-positives parmi lesquelles se déposent les cellules germinales primordiales (CGP) entre 10jpc et 11jpc.

(D) La crête génitale se développe et est progressivement recouverte de cellules dérivées du mésonéphros (M) qui migrent vers les crêtes génitales.

Adapté de (Rafal P. Piprek, Malgorzata Kloc, 2016)

Chapitre I : Le développement de la gonade

1. La formation des crêtes génitales (de la gonade bipotentielle)

1.1 Formation des crêtes génitales et leur devenir

Chez la souris, les gonades et les glandes surrénales ont une origine commune, à savoir le primordium gonado-surrénalien. Ce dernier apparaît au neuvième jour du développement embryonnaire (9,00jpc) (Ikeda et al., 1994), puis à 10,50jpc il se divise en deux parties. La partie antérieure deviendra le primordium surrénalien, tandis que la partie postérieure le primordium gonadique aussi appelé crêtes génitales (Vidal and Schedl, 2000).

C'est à partir de 10,00jpc chez la souris qu'apparaissent les crêtes génitales ou gonades bipotentielles. La première étape de leur formation est la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique monocouche qui devient alors plus épais et pseudostratifié à la surface ventrale du mésonéphros. Les cellules qui prolifèrent donneront naissance aux précurseurs somatiques de la gonade. Ensuite, la membrane basale qui supporte l'épithélium cœlomique se fragmente et devient discontinue, ce qui permet la colonisation des cellules épithéliales vers l'intérieur donnant un épithélium pluristratifié. Puis, les cellules vont réaliser leur transition appelée transition épithéliomésenchymateuse (EMT) (Karl et Capel, 1998) (Figure 1 et 2). Les mécanismes moléculaires guidant la formation des crêtes génitales à partir de l'épithélium cœlomique restent encore à élucider.

Néanmoins, plusieurs études ont permis de mettre en évidence le rôle et la cinétique d'expression spatiotemporelle de certains gènes dans cette formation, à savoir : *Gata4*, *Six1/4*, *Wt1*, *Lhx9*, *Insr/Igf1r*, *Emx2* et *Nr5a1*. Dans cette optique, des modèles murins invalidés pour chacun de ces gènes ont été générés.

A. *Gata4* (GATA-binding protein 4)

GATA4 (GATA-binding protein 4) appartient à la famille évolutivement très conservée des facteurs de transcription GATA dont la particularité est de contenir deux doigts de zinc (Evans and Felsenfeld, 1989). Le premier localisé dans la partie N-terminale permet de stabiliser la liaison avec l'ADN, tandis que le second localisé dans la partie C-terminale de GATA4 est

nécessaire à la liaison à l'ADN et à l'interaction avec d'autres protéines, notamment NR5A1 (Tremblay and Viger, 1999).

Chez la souris, GATA4 est détecté dans la partie antérieure des crêtes génitales à partir de 10,00jpc puis jusqu'à la partie postérieure à environ 10,20 jpc (Hu, Okumura et Page, 2013).

Son invalidation totale provoque la mort des embryons avant la formation des crêtes génitales. C'est pourquoi l'équipe de David Page a opté pour une invalidation conditionnelle après 8,75 jpc grâce à l'utilisation d'une recombinaise Cre inducible par le tamoxifène. Chez ces souris mâles et femelles *Gata4*^{-/-}, l'épaississement de l'épithélium cœlomique ne se produit pas à cause d'un défaut de prolifération des cellules ; il reste alors unistratifié et la membrane basale supportant l'épithélium cœlomique ne se fragmente pas. Par ailleurs, on observe également une réduction de l'expression de *Nr5a1* et *Lhx9*, deux gènes aussi impliqués dans le processus de formation des crêtes génitales (Hu, Okumura et Page, 2013).

Grâce à ces données, il a été possible d'établir que *Gata4* est indispensable à l'initiation de la formation des crêtes génitales ainsi qu'à l'expression des gènes nécessaires à la suite de leur développement.

B. Wt1 (Wilm's tumor suppressor 1)

WT1 (Wilm's Tumor suppressor 1) est un facteur de transcription à doigt de zinc exprimé très tôt dans l'épithélium cœlomique, chez la souris à partir de 9,50jpc (Armstrong et al., 1993). Chez l'homme plusieurs syndromes associés à des mutations dans le gène *Wt1* ont été décrits notamment les syndromes de Frasier (Frasier et al., 1964) ou de Denys-Drash (Pelletier et al., 1991 ; Drash et al., 1970). La première description du syndrome de Frasier en 1964 fait état d'une féminisation des organes génitaux externes, du développement de gonadoblastome (néoplasme composé de cellules germinales primitives et de cellules somatiques immatures), ainsi qu'une dysgénésie des testicules (Frasier et al., 1964). Pour le syndrome de Denys-Drash, on observe un pseudohermaphrodisme et un fort risque d'apparition de tumeurs de Wilm's (néphroblastome) (Drash et al., 1970).

Chez la souris, l'ablation totale de WT1 est létale car elle induit des malformations du cœur (Moore et al., 1999), de la rate (Ute Herzer , Alexander Crocoll , Debra Barton, 1999) ainsi qu'une agénésie des reins, des glandes surrénales et des gonades (Kreidberg et al., 1993). Il a

été montré qu'à partir de 11,00jpc l'augmentation de la mort cellulaire dans l'épithélium cœlomique était la cause de l'absence de gonade chez ces animaux (Kreidberg et al., 1993).

Chez la souris on ne dénombre pas moins de 24 isoformes de WT1. L'implication dans le développement de la gonade et des reins de deux isoformes a été particulièrement étudiée. Ces deux isoformes diffèrent par la présence ou l'absence des trois acides aminés « KTS » (lysine, threonine, et serine) localisés entre le troisième et le quatrième doigt de zinc à la fin de l'exon 9 de *Wt1*, c'est pourquoi elles ont été nommées -KTS et +KTS (Haber et al., 1991). En 2001, l'équipe de Andreas Schedl a généré deux modèles murins invalidés pour ces isoformes afin de déterminer plus précisément leurs rôles dans le développement de la gonade (Hammes et al., 2001). Dans les deux lignées, les mutations provoquent des malformations rénales létales peu de temps après la naissance.

Dans la lignée mutée pour +KTS, considérée comme modèle pour le syndrome de Frasier, on observe une inversion totale du sexe chez les animaux XY. Cette inversion est causée par une diminution de l'expression des gènes indispensables à la différenciation masculine, à savoir *Sry* (sex-determining region of Y chromosome) et *Amh* (anti-müllerian hormone). Ainsi, les auteurs concluent que l'isoforme +KTS est principalement impliquée dans la voie de la détermination du sexe masculin plutôt que dans la formation des crêtes génitales (Hammes et al., 2001).

En revanche, pour la lignée invalidée pour -KTS, on remarque une augmentation de l'apoptose dans l'épithélium cœlomique qui conduit à une réduction de la taille de la gonade. Les auteurs proposent alors que -KTS est important pour la survie des cellules et la formation de la gonade indifférenciée (Hammes et al., 2001). De plus, les travaux de Wilhelm et Engert ont montré que WT1, en coopération avec LHX9, était capable *in vitro* de réguler directement et positivement l'expression de *Nr5a1* qui est indispensable à la survie des cellules des crêtes génitales en formation.

Pour finir, il est intéressant de noter que les animaux *Wt1*^{-/-} présentent un phénotype gonadique plus sévère que les animaux -KTS, ce qui pourrait s'expliquer par la compensation de certaines isoformes entre elles (Wilhelm and Englert, 2002).

C. *Lhx9* (LIM homeobox9)

LHX9 (LIM homeobox9) fait partie de la famille des facteurs de transcription à homéodomaine permettant la liaison à l'ADN. Les souris 46XX et 46XY chez lesquelles l'exon

2 et 3 de *Lhx9* ont été délétés par recombinaison homologue affichent toutes un tractus urogénital féminin, une absence de gonade et une atrophie de l'utérus et du vagin. De plus, à 11,00jpc l'épithélium cœlomique affiche un faible nombre de cellules prolifératives BrdU-positives, qui conduit à 13,50jpc à une dégénérescence totale des gonades. De plus, l'expression de *Nr5a1* est fortement diminuée chez ces mutants (Birk et al., 2000), plaçant *Lhx9* comme potentiel régulateur positif de l'expression de *Nr5a1 in vivo*. Cette régulation de l'expression de *Nr5a1* par *Lhx9* permet de valider en partie l'hypothèse selon laquelle WT1 et LHX9 réguleraient ensemble positivement l'expression de *Nr5a1* (Wilhelm and Englert, 2002).

D. *Insr* (insulin receptor) et *Igf1r* (insulin-like growth factor 1 receptor)

De la même manière, il a été vu que les gènes codants pour le récepteur de l'insuline *Insr* (insulin receptor) et le récepteur transmembranaire *Igf1r* (insulin-like growth factor 1 receptor) sont essentiels au développement de la gonade. Les souris invalidées pour ces deux gènes montrent une dysplasie des gonades, une inversion du sexe chez les animaux XY et une absence de glandes surrénales. Dans les crêtes génitales, on observe aussi une baisse de la prolifération et une diminution du nombre de cellules NR5A1-positives, qui deviennent dans un contexte normal les cellules somatiques de la gonade (Pitetti et al., 2013).

E. *Six1/4* (sine oculis-related homeobox 1/4)

Deux autres gènes redondants sont exprimés très tôt dans l'épithélium cœlomique, à savoir *Six1* et *Six4* (sine oculis-related homeobox 1/4). SIX1 et SIX4 sont deux facteurs de transcription à domaines SIX responsables des interactions protéine-protéine et à homéodomaine permettant la liaison à l'ADN.

La double invalidation de ces gènes provoque une diminution de la taille des gonades et des glandes surrénales. Les auteurs notent aussi une diminution du nombre de cellules NR5A1-positives. Ils expliquent ce phénomène par le fait que SIX1 et SIX4 sont capables de se fixer sur le promoteur de *Nr5a1* pour augmenter son expression. Ainsi, ils proposent que SIX1 et SIX4 soient responsables de la régulation de la taille des gonades en modulant l'expression de *Nr5a1*, et donc le nombre de précurseurs somatiques. De plus, *Six1* et *Six4* seraient aussi impliqués dans l'EMT car en leur absence ce phénomène est retardé en plus d'être diminué (Fujimoto et al., 2013).

F. *Emx2* (empty spiracles homeobox 2)

EMX2 (empty spiracles homeobox 2) est un facteur de transcription à homéodomaine, normalement exprimé chez la souris à partir de 10,50jpc dans les cellules de l'épithélium cœlomique.

L'inactivation de *Emx2* provoque l'absence des reins et du tractus urogénital (Miyamoto et al., 1997). Chez les souris *Emx2*^{-/-} les gonades se forment normalement jusqu'à 12,00jpc où une augmentation de l'apoptose entraîne l'agénésie des gonades. De plus, l'équipe de Ken-Ichirou Morohashi a étudié la localisation et l'expression de protéines intervenant dans la régulation de l'assemblage des jonctions serrées caractéristiques des cellules épithéliales, notamment l'occludine, TJP1 (Tight junction protein ZO-1) et le complexe aPKC. En l'absence de EMX2, ces protéines, normalement localisées dans la région apicolatérale de l'épithélium gonadique, se retrouvent de manière irrégulière sur toute la surface des cellules, indiquant une perte de polarité de l'épithélium. Pour finir, les auteurs de cette étude ont aussi montré que les cellules de l'épithélium cœlomique sont incapables de réaliser leur migration à travers la membrane basale ni l'EMT (Kusaka et al., 2010).

G. *Nr5a1* (steroidogenic factor 1)

NR5A1 (steroidogenic factor 1), aussi appelé SF-1 ou AB4BP, est un récepteur nucléaire orphelin, facteur de transcription à doigt de zinc qui, à l'inverse de beaucoup de récepteurs nucléaires, se lie à l'ADN sous forme de monomère (voir Chapitre III.2.NR5A1) *Nr5a1* est exprimé d'abord dans l'épithélium cœlomique, puis dans les crêtes génitales et reste ensuite exprimé dans les cellules somatiques de la gonade mâle à savoir les cellules de Sertoli et de Leydig. Ainsi, *Nr5a1* est considéré dans les crêtes génitales comme le marqueur des précurseurs somatiques de la gonade.

Chez l'homme, des mutations dans ce gène induisent des phénotypes assez variables et plus ou moins importants. Le phénotype commun aux patients 46XY et XX est une insuffisance surrénalienne. Concernant les patients 46XY, on observe des dysgénésies testiculaires plus ou moins sévères ou encore une inversion sexuelle du tractus génital avec différents degrés de féminisation. Des patients 46XX peuvent présenter une insuffisance ovarienne et une endométriose (Revue : Ferraz-de-Souza, Lin and Achermann, 2011).

Gène invalidé	Nom complet	Phénotype induit par la perte de fonction	Référence
<i>Gata4</i>	GATA-binding protein 4	Absence de gonade. Défaut de prolifération et d'épaississement de l'épithélium cœlomique	Hu et al., 1993
<i>Wt1(+kts)</i>	Wilm's Tumor suppressor 1	Inversion du complète du sexe	Hammes et al.,2001
<i>Wt1(-kts)</i>	Wilm's Tumor suppressor 1	Dégénérescence des crêtes génitales due à une augmentation de l'apoptose	Wilhelm et al., 2002
<i>Lhx9</i>	LIM Homeobox9	Dégénérescence des crêtes génitales due à une diminution de la prolifération	Birk et al.,2000
<i>Insr/Igf1r</i>	Insulin receptor / Insulin-like growth factor 1 receptor	Inversion du sexe et diminution de la prolifération des crêtes génitales	Pitetti et al.,2013
<i>Six1/4</i>	Sine oculis-related homeobox 1/4	Diminution de la taille des gonades avec inversion du sexe et défaut de l'EMT Diminution du nombre de cellules NR5A1-positives	Fijumito et al.,2013
<i>Emx2</i>	Empty spiracles homeobox 2	Dégénérescence des crêtes génitales due à une augmentation de l'apoptose et défaut de l'EMT	Kusaka et al.,2010 Miyamoto et al.,1997
<i>Nr5a1</i>	Steroidogenic factor 1	Dégénérescence des crêtes génitales due à une augmentation de l'apoptose et défaut de l'EMT	Luo et al.,1994
<i>Pod1</i>	Podocyte expressed-1	Hypoplasie des gonades. Augmentation de l'apoptose dans les crêtes génitales	Cui et al.,2004 Tamura et al.,2001
<i>Cbx2</i>	Chromobox protein homolog 2	Inversion du complète du sexe Défaut de prolifération et d'épaississement des crêtes génitales	Kutoh-Fukui et al.,1998 Kutoh-Fukui et al.,2012

Table 1 : Gènes participants à la formation des crêtes génitales et le phénotype induit par leur invalidation

Chez la souris, l'inactivation de *Nr5a1* est létale quelques heures après la naissance à cause d'une agénésie des glandes surrénales. A 10,00jpc l'épithélium cœlomique est comparable à celui d'un contrôle, mais à partir de 12,00jpc les gonades ont pratiquement disparu chez les mâles et femelles. Cette disparition est due à une augmentation de la mort des cellules épithéliales par apoptose si bien qu'à la naissance les gonades sont absentes (Luo et al., 1994).

Nr5a1 joue un rôle central dans le développement des crêtes génitales. En effet, *Gata4*, *Wt1*, *Lhx9*, *Emx2* ont tous des rôles différents durant la formation des gonades, mais l'inactivation de chacun d'entre eux conduit à une diminution de l'expression de *Nr5a1* et une absence de gonade, ce qui place *Nr5a1* en tant que gène essentiel à ce processus grâce aux précédentes études présentées.

De plus, après l'épaississement de l'épithélium cœlomique deux gènes sont susceptibles de réguler l'expression de *Nr5a1* pour induire la prolifération cellulaire et la différenciation des crêtes génitales.

Premièrement, POD1 (Podocyte expressed-1 aussi appelé TCF21 pour Transcription factor 21) est un facteur de transcription dont l'inactivation provoque l'augmentation de l'expression de *Nr5a1* et l'apoptose ce qui conduit à une hypoplasie des gonades dans les deux sexes ; *Pod1* est donc considéré comme un inhibiteur de l'expression de *Nr5a1*. Néanmoins, cette action serait indirecte car les auteurs n'ont pas réussi à montrer que POD1 se fixe directement sur le promoteur de *Nr5a1*. Ils proposent donc que chez le mâle, en l'absence de POD1, *Nr5a1* soit exprimé dans tous les précurseurs somatiques de la gonade, ce qui induit une différenciation prématurée en cellules stéroïdogènes. Cette étude permet aussi de mettre en évidence l'action « dose-dépendante » de *Nr5a1* : l'augmentation, comme la réduction, de son expression influence le développement de la gonade.

Deuxièmement, CBX2 (Chromobox protein homolog 2) qui fait partie du groupe des protéines polycomb connues pour remodeler la chromatine (Schuettengruber and Cavalli, 2009). Chez l'homme, des patients XY avec une mutation dans le gène *CBX2* présentent une inversion du sexe avec un utérus et des ovaires (Biaison-Lauber et al., 2009). Chez la souris, *Cbx2* est exprimé dans les crêtes génitales et son inactivation cause une hypoplasie des gonades ainsi qu'une inversion de sexe chez les animaux 46XY. Cette inactivation provoque aussi une baisse de la prolifération cellulaire et de l'expression de *Nr5a1* et *Lhx9*, deux gènes aussi impliqués dans la prolifération cellulaire à ce stade du développement (Katoh-Fukui et al., 2012 ; Katoh-fukui et al., 1998). La régulation de *Nr5a1* par *Cbx2* se fait vraisemblablement de manière directe car des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine de cellules

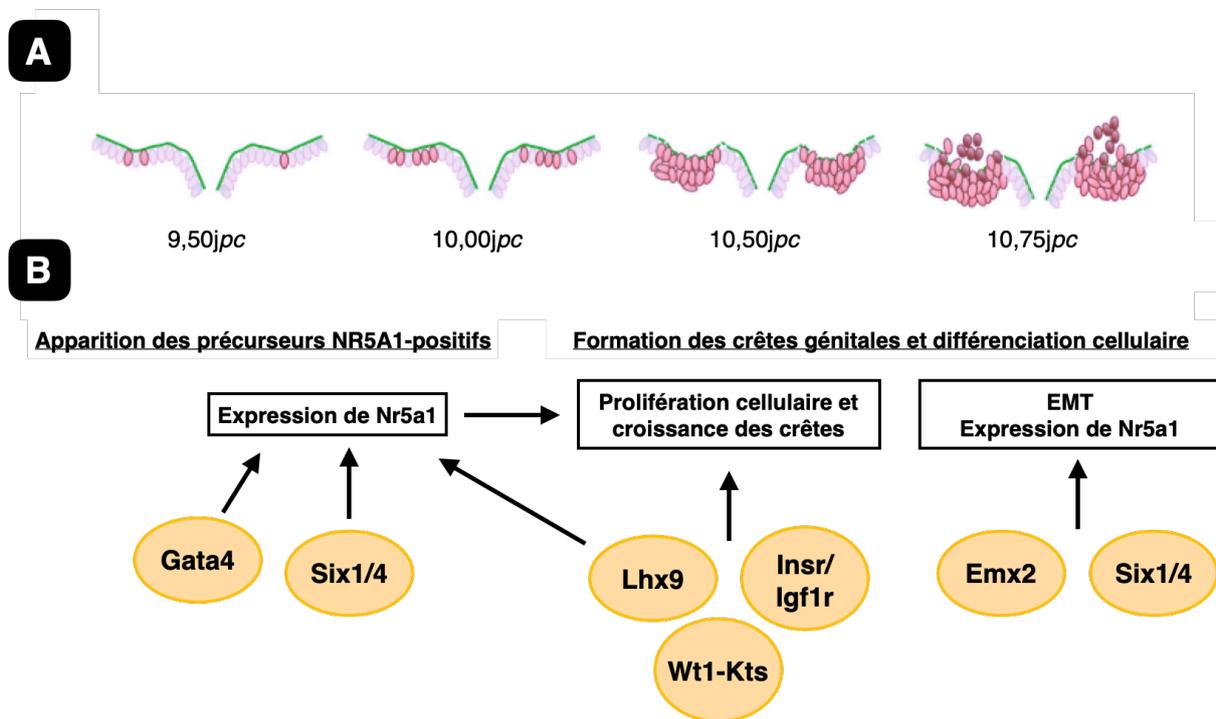


Figure 2 : Schéma du réseau moléculaire qui régule la formation et le développement des précurseurs gonadiques NR5A1-positifs

(A) A 9,50jpc les cellules précurseurs NR5A1-positives apparaissent dans l'épithélium coelomique. Leur nombre augmente à 10,00jpc pour former un épithélium pseudostratifié à 10,50jpc. Ensuite, les précurseurs NR5A1-positifs migrent dans la région du mésenchyme interne dorsal à travers la membrane basale pour former la crête génitale à 11,75jpc. Dans les gonades XY, une partie seulement des précurseurs NR5A1-positifs exprimeront ensuite *Sry* pour se différencier en cellules de Sertoli.

(B) *Gata4* est responsable de l'initiation de la formation des crêtes génitales avec *Six1* et *Six4*. Ensemble ces facteurs de transcription vont permettre l'apparition des cellules NR5A1-positives. *Lhx9*, *Wt1-KTS* et *Insr/Igf1r* sont nécessaires pour promouvoir la prolifération des précurseurs gonadiques et former les crêtes génitales (ou gonade bipotentielle). *Emx2* et éventuellement *Six1* et *Six4* contribuent à la régulation de la transition épithéliomésenchymateuse (EMT). Dans le même temps, *Lhx9*, *Wt1-KTS*, *Insr/Igf1r* et *Emx2* vont réguler l'expression de Nr5a1 à la hausse.

Adapté de (Tanaka and Nishinakamura, 2014)

surréaliennes immortalisées ont mis en évidence que CBX2 se fixe directement sur *Nr5a1* (Katoh-Fukui et al., 2005).

Pour conclure, toutes les études précédemment citées ont permis de mieux comprendre le rôle de chaque gène impliqué dans le développement des gonades et ainsi de reconstituer la chronologie de la formation des crêtes génitales et les relations d'interdépendance pour l'expression de chacun des acteurs (**Table 1**). En effet, *Gata4* est responsable de l'initiation de la formation des crêtes génitales, avec *Six1* et *Six4* qui permettent l'apparition des précurseurs somatiques de la gonade qui expriment NR5A1. Puis *Wt1*, *Emx2* et *Nr5a1* sont indispensables à la formation des crêtes génitales à partir de 12,00jpc et sont impliqués dans la survie des cellules. *Lhx9* est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire. De plus, *Emx2* et *Six1/Six4* sont des acteurs de l'EMT. Enfin, *Nr5a1* sous le contrôle de *Cbx2* et *Pod1* permet la différenciation et la prolifération des cellules après l'épaississement de l'épithélium cœlomique. Toutes ces informations mettent en lumière une régulation complexe de *Nr5a1* par différents acteurs, son rôle essentiel dans la formation des crêtes génitales, mais aussi dans la différenciation des précurseurs des cellules somatiques de la gonade (**Figure 2**).

Dans le même temps, loin des crêtes génitales en formation et de manière totalement indépendante, apparaissent les cellules germinales primordiales (CGP) qui donneront naissance aux cellules de la lignée germinales.

1.2 Les cellules germinales primordiales (CGP)

Les cellules germinales primordiales (CGP) sont les cellules qui donneront naissance à la lignée germinale. Chez la souris, les CGP sont issues d'un épithélium pluripotent éloigné de la gonade. Pour devenir des cellules germinales et rejoindre leur emplacement définitif, les cellules passent par trois étapes : la spécification, la migration puis la colonisation (**Figure 3**).

A. La spécification

A 6,25 jpc les CGP apparaissent dans l'épiblaste proximal, grâce à des signaux inducteurs reçus par un petit nombre de cellules (Lawson and Hage, 1994). Le premier signal inducteur reçu par ces cellules de l'épiblaste proximal est émis par l'ectoderme extra-embryonnaire et

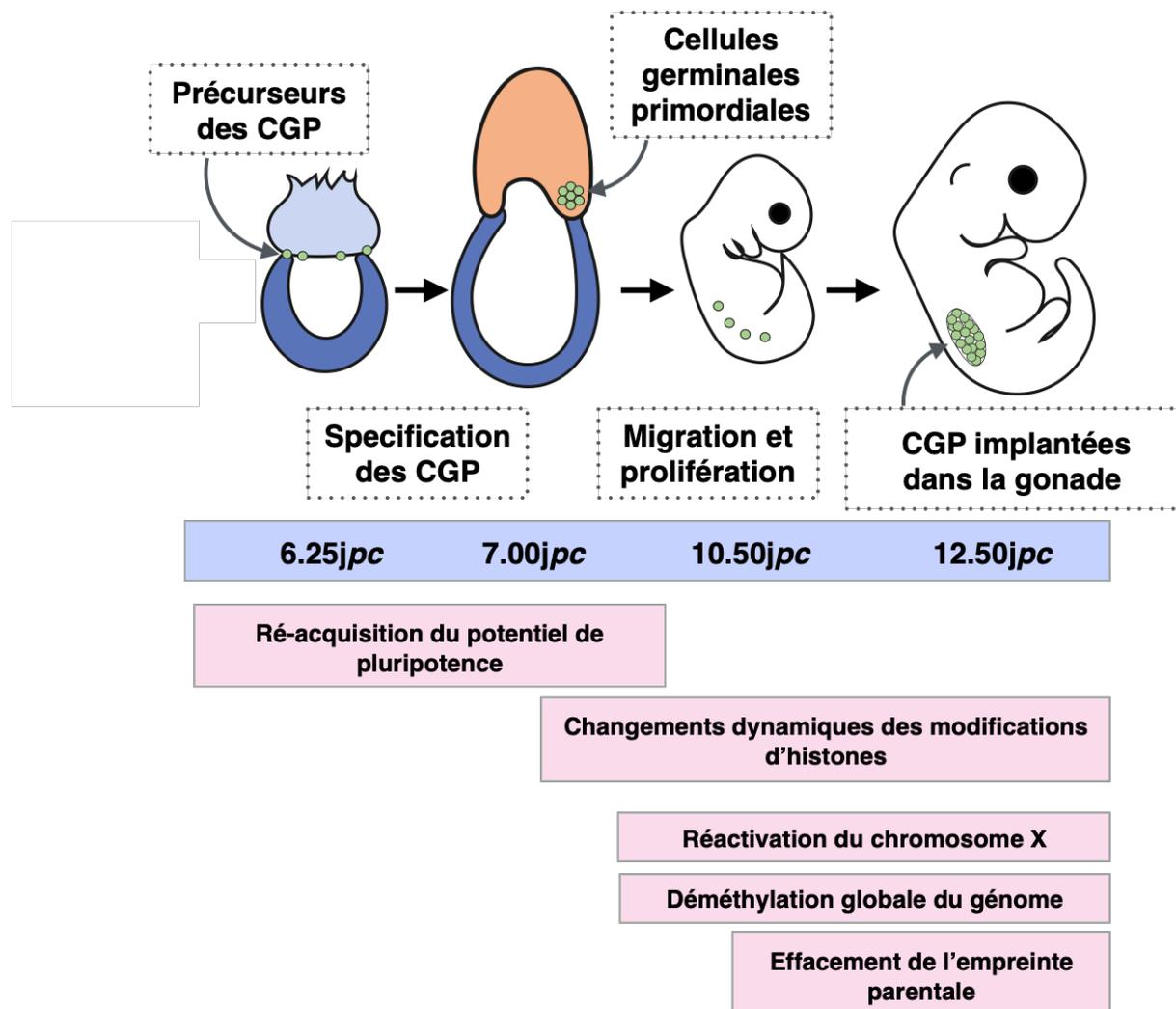


Figure 3 : Chronologie du développement des cellules germinales progénitrices

Les cellules germinales progénitrices (CGP) apparaissent à partir de 6,25jpc dans l'épiblaste proximal et y réalisent leur spécification. Puis à 7,00jpc elles forment une grappe d'environ 20 cellules qui vont commencer à migrer. Durant leur migration les CGP prolifèrent en se déplaçant le long de l'intestin jusqu'au mésentère pour rejoindre les crêtes génitales et les coloniser entre 10,00jpc et 11,00jpc. Pendant leurs spécification, migration et colonisation, les CGP vont réexprimer des gènes de pluripotence comme *Sox2* ou *Nanog* et subir une importante reprogrammation épigénétique.

Adapté de (Sasaki and Matsui, 2008) et (Saitou et al., 2012)

l'endoderme viscéral. Ces derniers expriment plusieurs facteurs de croissance de la famille des BMP (Bone Morphogenetic Protein), à savoir BMP4, BMP8b et BMP2.

BMP4 fut le premier dont le rôle a été découvert dans ce mécanisme. Il est essentiel à la spécification des CGP. En effet, l'inactivation d'une copie de *Bmp4* provoque une diminution du nombre CGP et son inactivation complète une absence totale des CGP (Lawson et al., 1999). Plus tard il a été montré que les invalidations de *Bmp2* et *Bmp8* conduisent à des phénotypes similaires, c'est-à-dire l'absence ou la diminution importante du nombre de CGP (Ying et al., 2000 ; Ying and Zhao, 2001). Les protéines BMP agissent grâce aux protéines SMAD1, SMAD4 et SMAD5 (Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic) qui transmettent le signal. L'invalidation de ces Smad, comme des Bmp, conduit à une diminution, voire une absence, de CGP (Tremblay et al., 2001b ; Hayashi et al., 2002 ; Chang and Matzuk, 2001 ; Chu et al., 2004). Plus récemment, Ian Chambers et son équipe constatent aussi que BMP4 réprime l'expression du facteur de transcription *Oxt2* (Orthodenticle Homeobox 2). Chez les mutants *Oxt2*^{-/-} le nombre de CGP est augmenté car *Oxt2* est régulateur négatif de la spécification des CGP. En somme, BMP4 réprime l'expression de *Oxt2* pour permettre l'expression des gènes nécessaires à la spécification des CGP : *Blimp1* et *Prdm14* (Zhang et al., 2018). Ensuite, l'expression de *Wnt3* (Wnt family member 3) par l'endoderme viscéral permet aux cellules d'être capable de réagir à l'induction par BMP4 (Ohinata et al., 2009). Dans le même temps, pour éviter la spécification de toutes les cellules de l'épiblaste en CGP un certain nombre d'antagonistes de BMP et WNT3 sont exprimés comme, par exemple *Cer1* (Cerberus 1) ou *Dkk1* (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1).

Les cellules ayant répondu aux signaux inducteurs expriment *Blimp1* (B-lymphocyte maturation- induced protein 1, aussi appelé *Prdm1* pour PR domain zinc finger protein 1) et *Prdm14* (PR domain zinc finger protein 1) (Yamaji et al., 2008 ; Ohinata et al., 2005). L'expression de ces gènes va permettre la répression de l'expression des gènes somatiques mésodermiques comme *Hoxa1* et *Hoxb1*, et la réacquisition de gènes de pluripotence comme *Sox2* et *Nanog* (Saitou, 2002 ; Yabuta et al., 2006 ; Campolo et al., 2013). L'invalidation de *Blimp1* provoque une diminution du nombre de CGP, l'expression aberrante de marqueurs spécifiques des CPG, à savoir *Nanos3* et *Stella*. Elle empêche aussi la répression des gènes somatiques (Ohinata et al., 2005). En revanche la répression des gènes somatiques se fait correctement chez les mutants *Prdm14* mais l'activation des gènes de pluripotence est altérée (Yamaji et al., 2008). A ce stade, une quarantaine de CGP sont présentes à la base de l'allantoïde (Ohinata et al., 2005). Avec la réexpression des gènes de pluripotence, les CGP vont subir une importante reprogrammation épigénétique de leur génome, à savoir une déméthylation globale

de leur génome qui se fait en deux étapes. Une première déméthylation globale du génome a lieu à 8,00jpc puis une seconde à 12,50jpc qui permet l'effacement de l'empreinte parentale. L'empreinte parentale est le fait que les copies d'un gène sont exprimées différemment en fonction du parent dont elles sont héritées. Dans le même temps, les expressions de *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* (DNA methyltransferases) sont aussi fortement diminuées. Ces gènes codent pour les protéines responsables du dépôt de la méthylation (Seki et al., 2005 ; Seisenberger et al., 2012). Au niveau de la chromatine on constate un effacement de la marque répressive H3K9 di-méthyle et une augmentation de la marque H3K27 tri-méthyle. La présence des marques activatrices de la transcription comme H3K4 méthyle et H3K9 acétyle est assez constante, mais augmente de manière transitoire au moment de la colonisation des CGP dans les crêtes génitales à 10,50jpc (Seki et al., 2005 ; Seki et al., 2007). Chez les femelles s'ajoute à cela une réactivation du chromosome X causée par la diminution de la marque H3K27 tri-méthyle (de Napoles et al., 2007). Récemment, il a été montré que l'augmentation de la présence de la marque H3K27 tri-méthyle au niveau global du génome et sa diminution au niveau du chromosome X se font de manière indépendante mais en faisant intervenir PRDM14 dans les deux cas (Mallol et al., 2019).

B. La migration

Une fois spécifiées, les CGP doivent coloniser les crêtes génitales. Pour cela, elles vont entreprendre une migration à travers l'embryon. Pour suivre les mouvements des CGP, les chercheurs ont beaucoup utilisé la coloration à la phosphatase alcaline (Chiquoine, 1954 ; Tam and Snow, 1981).

A 7,00jpc les CGP commencent à migrer de la base de l'allantoïne, puis traversent la ligne primitive pour arriver dans l'endoderme de l'intestin postérieur. Les CGP se déplacent le long de l'intestin jusqu'au mésentère, qui est la porte d'entrée pour coloniser les gonades à partir de 10,50jpc et jusqu'à 11,50jpc (Anderson et al., 2000). Durant cette étape, les CGP doivent se déplacer, mais elles doivent aussi proliférer, passant d'une quarantaine à environ 1000 cellules à 10,50jpc, puis 3000 à 11,00jpc à la fin de la migration (Tam and Snow, 1981). Plusieurs acteurs sont impliqués dans ces processus, certains régulant plutôt la migration et d'autres la multiplication des cellules.

Pour se déplacer, les CGP ont besoin de rester en contact non seulement les unes avec les autres mais aussi avec leur environnement, via des extensions cytoplasmiques et la présence de

molécules présentes à leur surface comme l'E-cadhérine et l'intégrine- β 1. L'inactivation des gènes codant pour ces protéines, provoque la localisation ectopique des CGP qui sont incapables de rejoindre les crêtes génitales (Anderson et al., 1999 ; Bendel-Stenzel et al., 2000 ; Di Carlo and De Felici, 2000). Grâce à une autre étude, on sait que le récepteur tyrosine kinase ROR2 (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2) et son ligand WNT5 (Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 5) sont aussi impliqués dans la migration et la survie des CGP. L'inactivation de *Ror2* ou *Wnt5* conduit au même phénotype, c'est-à-dire une anomalie de la polarité, de la forme et de la migration des CGP. En effet, peu de CGP arrivent jusqu'aux crêtes génitales, la plupart d'entre elles restant dans l'intestin et un petit nombre ayant une localisation ectopique comme dans la peau (Chawengsaksophak et al., 2012 ; Laird et al., 2011). De plus, *Wnt5* est décrit comme ayant un rôle pivot en régulant la prolifération des CGP mais aussi leur migration, en activant deux voies. En effet, WNT5 via la voie *Ror2* permet de réguler la migration des CGP. Mais, WNT5 est aussi impliqué dans une voie faisant intervenir *β -caténine* qui est responsable de la prolifération des CGP. WNT5 est donc un acteur clé qui permet de réguler la balance entre la migration et la prolifération des CGP, deux phénomènes normalement peu compatibles (Cantú et al., 2016). Dans leur étude, Kathryn Anderson et son équipe proposent aussi que l'activation de la voie ROR2/WNT5 permet aux cellules de répondre au signal émis par le facteur de croissance KITL (Kit ligand) (Laird et al., 2011). En effet, les récepteurs C-KIT et CXCR4 (GPCR chemokine (CXC motif) receptor 4) aussi appelés SDF1, sont exprimés à la surface des CGP, tandis que leurs ligands respectifs KITL et CXCL2 sont exprimés par les cellules somatiques présentes tout au long du trajet des CGP. L'inactivation de *Kitl* provoque l'apoptose des CGP qui peut être empêchée en invalidant *Bax* (BCL-2 associated X protein) simultanément. En revanche la double inactivation de *Kitl* et *Bax* n'empêche pas la mauvaise migration des CGP et la diminution de leur nombre à cause d'un défaut de prolifération (Runyan et al., 2006). De la même manière, l'expression d'une version mutée de CXCR4 provoque une baisse du nombre de CGP et une mauvaise colonisation des crêtes génitales. En revanche, une surexpression de CXCL2 augmente la survie des CGP, mais induit des anomalies de migration (Molyneaux et al., 2003).

C. La colonisation

Grâce à l'expression de ces acteurs, les CGP sont capables de migrer et de proliférer dans le même temps. Ainsi, une fois leur migration accomplie les CGP colonisent les crêtes génitales,

où elles sont alors appelées gonocytes. Les mécanismes permettant l'arrêt de la migration des CGP ne sont pas encore élucidés. Par contre, on sait qu'une fois arrivées dans les crêtes génitales les CGP doivent se rapprocher les unes des autres, impliquant une augmentation de l'expression des cadhérines aux sites de contacts entre les cellules notamment l'E-cadhérine et la N-cadhérine (Bendel-Stenzel et al., 2000 ; Di Carlo and De Felici, 2000). De plus, les gonocytes expriment certains marqueurs spécifiques comme DAZL (deleted in azoospermia like) ou DDX4 (DEAD-Box Helicase 4) aussi appelés VASA ou MVH. L'invalidation de *Dazl* a permis de montrer que son rôle est d'inhiber l'expression des gènes de pluripotence comme *Sox2* ou *Nanog*. En l'absence de *Dazl*, les cellules ne sont pas capables de devenir des gonocytes et gardent un profil génique de CGP (Gill et al., 2011).

L'avenir des gonocytes dépendra ensuite du sexe de l'individu. Ainsi, chez le mâle les gonocytes rentreront en quiescence jusqu'à la naissance tandis que les gonocytes chez la femelle rentreront en méiose. Ces mécanismes sont décrits dans la partie (2.3 Le testicule fœtal : Différenciation des cellules germinales).

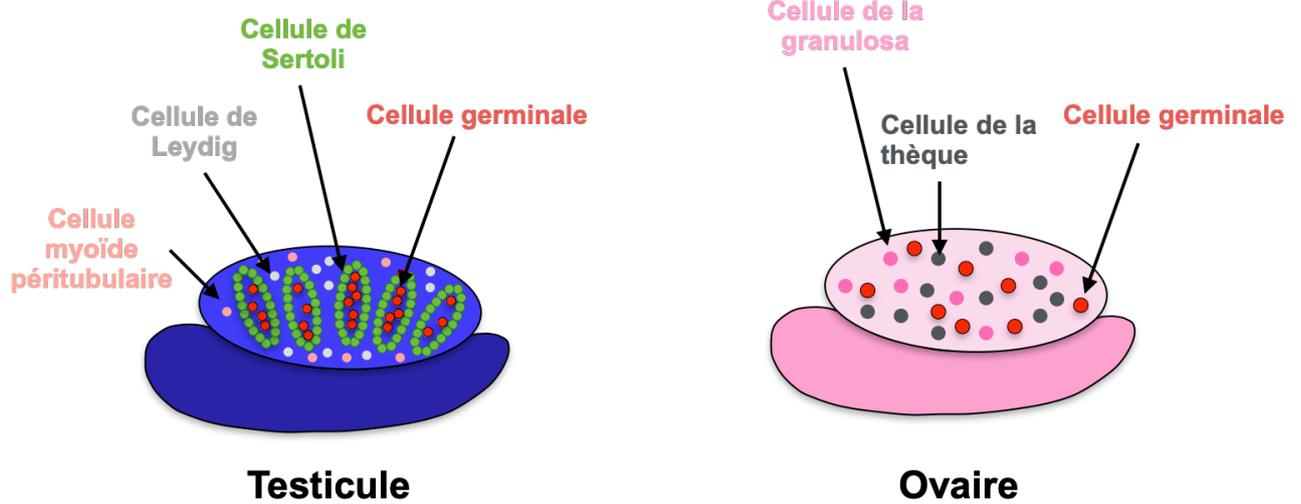


Figure 4 : Dynamique d'apparition et de différenciation des cellules somatiques à partir des mêmes précurseurs cellulaires lors de la détermination du sexe

Composition des principaux types cellulaires de la gonade fœtale mâle et femelle. Dans le testicule fœtal les cordons séminifères sont composés des cellules germinales et des cellules de Sertoli. Le tissu interstitiel est composé des cellules de Leydig et des cellules myoïdes péritubulaires. Chez la femelle l'ovaire est composé des cellules germinales des cellules de la granulosa et des cellules de la thèque.

2. Développement de la gonade

2.1. Le testicule fœtal : Différenciation des cellules somatiques

Dans l'ovaire et le testicule il y a deux principaux types de cellules somatiques appelées cellules de soutien et cellules stéroïdogènes. Les cellules de soutien sont les cellules de la granulosa chez la femelle et de Sertoli (CS) chez le mâle. Les cellules stéroïdogènes sont les cellules de la thèque chez la femelle et de Leydig (CL) chez le mâle (**Figure 4**).

Avant de décrire l'apparition des différentes lignées somatiques de l'ovaire et du testicule fœtal, il est nécessaire d'introduire la notion de différenciation sexuelle des gonades. La différenciation sexuelle fait référence à la décision de la gonade bipotentielle de se développer en testicules ou en ovaire en fonction de son sexe chromosomique. Une fois différenciées, les gonades produisent les hormones nécessaires au développement des tractus génitaux mâles ou femelles (Stévant and Nef, 2019).

A. Les cellules de Sertoli

Les cellules de l'épithélium cœlomique NR5A1-positives présentes dans l'épithélium cœlomique sont les précurseurs des cellules de Sertoli (CS) du testicule (Karl and Capel, 1998). Les CS sont les premières cellules à se différencier dans les testicules (Magre et Jost 1980). La différenciation des CS est un phénomène rapide et dynamique qui fait intervenir des vagues d'expression de gènes avec plusieurs étapes intermédiaires d'activation ou répression et des pics de coexpression que nous décrirons ci-dessous (**Table 2**) (Stévant et al., 2018).

a. *Sry (Sex-determining Region of Y chromosome)*

Durant de nombreuses années, des équipes ont cherché à identifier le facteur déterminant la formation du testicule appelé TDF pour « testis-determining factor ». Dans les années 1990 l'équipe de Robin Lovell-Badge a notamment étudié des patients XX qui présentaient un phénotype masculin et possédaient une portion de chromosome Y. Grâce à ces études, ils ont pu déterminer la portion minimum du chromosome Y requise pour induire une différenciation masculine. Puis, dans cette portion du chromosome Y ils ont découvert un gène qu'ils ont appelé *Sry* pour « Sex-determining Region of Y chromosome » qui constitue le TDF chez l'homme et chez la souris (Gubbay et al., 1990 ; Sinclair et al., 1990). Le gène *Sry* localisé sur le chromosome Y code pour un facteur de transcription contenant un domaine de liaison à

Gène	Nom complet	Fonctions dans le testicule	Référence
<i>Sry</i>	Sex-determining Region of Y chromosome	Induire la différenciation masculine Induire l'expression de <i>Sox9</i> via TESCO et Enh 13	Sinclair et al., 1990 ; Gubbay et al., 1990 ; Sekido and Lovell-Badge, 2008 ; Gonen et al., 2017
<i>Sox9</i>	SRY-Box Transcription Factor 9	Induire la différenciation des cellules de Sertoli Induire l'expression d' <i>Amh</i> Maintenir l'identité masculine et la fertilité chez le mâle	Chaboissier et al., 2004 ; Bi et al., 2001 ; Barrionuevo et al., 2009 ; Lavery et al., 2011 ; Shen et al., 1994 ; Giuili et al., 1997 ; De Santa Barbara et al., 1998 ; Arango et al., 1999 ; Arango et al., 1999 ; Tremblay et al., 2001a
<i>Dmrt1</i>	Dsx and Mab-3-related Transcription factor 1	Maintien de l'identité masculine	Matson et al., 2011 ; Raymond et al., 2000 ; Fahrioglu et al., 2006
<i>Amh</i>	Anti-Müllerian Hormone	Dégénérescence des canaux de Müller chez le mâle	Behringer et al., 1994 ; Mishina et al., 1996 ; Bouchard et al., 2019
<i>Dhh</i>	Desert hedgehog	Différenciation des cellules interstitielles	Bitgood et al., 1996 ; Clark et al., 2000 ; Pierucci-Alves et al., 2001 ; Yao et al., 2002
<i>Sox8</i>	SRY-Box Transcription Factor 8	Bon déroulement de la spermatogénèse Maintien de l'architecture testiculaire Capable de compenser l'action de <i>Sox9</i> pour activer <i>Amh</i>	Sock et al., 2001 ; Bryan et al., 2008 ; Singh et al., 2013 ; Schepers et al., 2003
<i>Sox10</i>	SRY-Box Transcription Factor 10	Induire l'expression de <i>Sox9</i> via TESCO Capable de compenser l'action de <i>Sox9</i> pour activer <i>Amh</i>	Polanco et al., 2009
<i>Sox3</i>	SRY-Box Transcription Factor 3	Induire l'expression de <i>Sox9</i> via TESCO Capable de compenser l'action de <i>Sox9</i> pour activer <i>Amh</i> Impliqué dans le bon déroulement de la spermatogénèse	Sutton et al., 2011 ; Weiss et al., 2003
<i>Sox4</i>	SRY-Box Transcription Factor 4	Impliqué dans la différenciation des cellules germinales et dans l'organisation des cordons séminifères Induire l'expression de <i>Sox9</i> via TESCO	Zhao et al., 2017
<i>Wtl</i>	Wilm's tumor suppressor 1	Activation de <i>Sry</i> Régulation de l'expression de <i>Nr5a1</i> Différenciation des cellules somatiques de soutien et stéroïdogènes	Chen et al., 2017 ; Gao et al., 2006)(Zhang et al., 2015
<i>Nr5a1</i>	Steroidogenic factor 1	Différenciation des cellules somatiques de soutien et stéroïdogènes Régulation de l'expression de <i>Sox9</i> et <i>Amh</i>	Anamthmakula et al., 2019

Table 2 : Gènes exprimés par les cellules de Sertoli et participants à la différenciation testiculaire

l'ADN caractéristique de la famille des protéines HMG pour « High-mobility group ». De plus, *Sry* fait partie de la famille des gènes *Sox* (Sry-related HMG box) comprenant 20 membres (Bowles et al., 2000).

Chez la souris, *Sry* est le premier gène exprimé par les précurseurs des CS, appelés pré-CS, à partir de 10,50jpc et jusqu'à 12,50jpc avec un pic d'expression maximum à 11,50jpc (Koopman et al., 1990 ; Hacker et al., 1995 ; Jeske et al., 1995 ; Bullejos and Koopman, 2001). L'ARNm et la protéine SRY sont d'abord détectés au centre des crêtes génitales à 10,50jpc pour ensuite s'étendre aux pôles postérieur et antérieur. A 11,50jpc, *Sry*/SRY est détecté sur toute la longueur des crêtes génitales (Wilhelm et al., 2005). L'expression de *Sry* durant cette fenêtre de temps précise est indispensable au développement du testicule. Si *Sry* est exprimé après 11,30jpc, l'activation des gènes qu'il régule en aval est impossible ce qui provoque un développement ovarien (Hiramatsu et al., 2009). De la même manière, une expression insuffisante de *Sry* ne permet pas d'induire l'activation des gènes en aval (Wilhelm et al., 2009).

La régulation spatiotemporelle précise de *Sry* nécessite de nombreux facteurs et modifications épigénétiques dont les mécanismes d'action restent encore à élucider (Figure 5). Néanmoins, on sait que WT1 et plus particulièrement son isoforme +KTS régule à la hausse l'expression de *Sry*. En effet, l'invalidation de l'isoforme +*kts* chez la souris induit une forte diminution de l'expression de *Sry* ainsi qu'une diminution de la prolifération des pré-CS. A terme cela conduit à un nombre insuffisant de CS dans le testicule, ce qui est aussi observé chez les patients atteints du syndrome de Frasier (Hammes et al., 2001 ; Bradford et al., 2009 ; Hossain and Saunders, 2001). Il est cependant impossible de dire si la diminution d'ARN messenger de *Sry* est causée par une diminution de l'expression du gène, ou par une instabilité de l'ARN messenger produit. Cette question est légitime quand on sait que l'isoforme +KTS a une meilleure affinité de liaison avec les ARN comparé à l'ADN (Kennedy et al., 1996 ; Caricasole et al., 1996). Par ailleurs, chez la souris, l'implication de *Sry* dans la prolifération cellulaire a été montrée par l'équipe de Blanche Capel en quantifiant les cellules en prolifération grâce à l'incorporation de la 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Schmahl et al., 2000)

Le facteur de transcription GATA4 et son cofacteur FOG2 (Zinc finger protein ZFPM2) sont aussi impliqués dans la régulation de *Sry* de manière dose dépendante (Tevosian et al., 2002). Ainsi, une mutation dans le gène *Gata4* empêchant l'interaction avec FOG2 (Tevosian et al., 2002), comme l'invalidation de *Fog2* ou *Gata4* (Bouma et al., 2007 ; Manuylov et al., 2011), conduit à une diminution de l'expression de *Sry* entraînant des défauts de différenciation des CS et des CL.

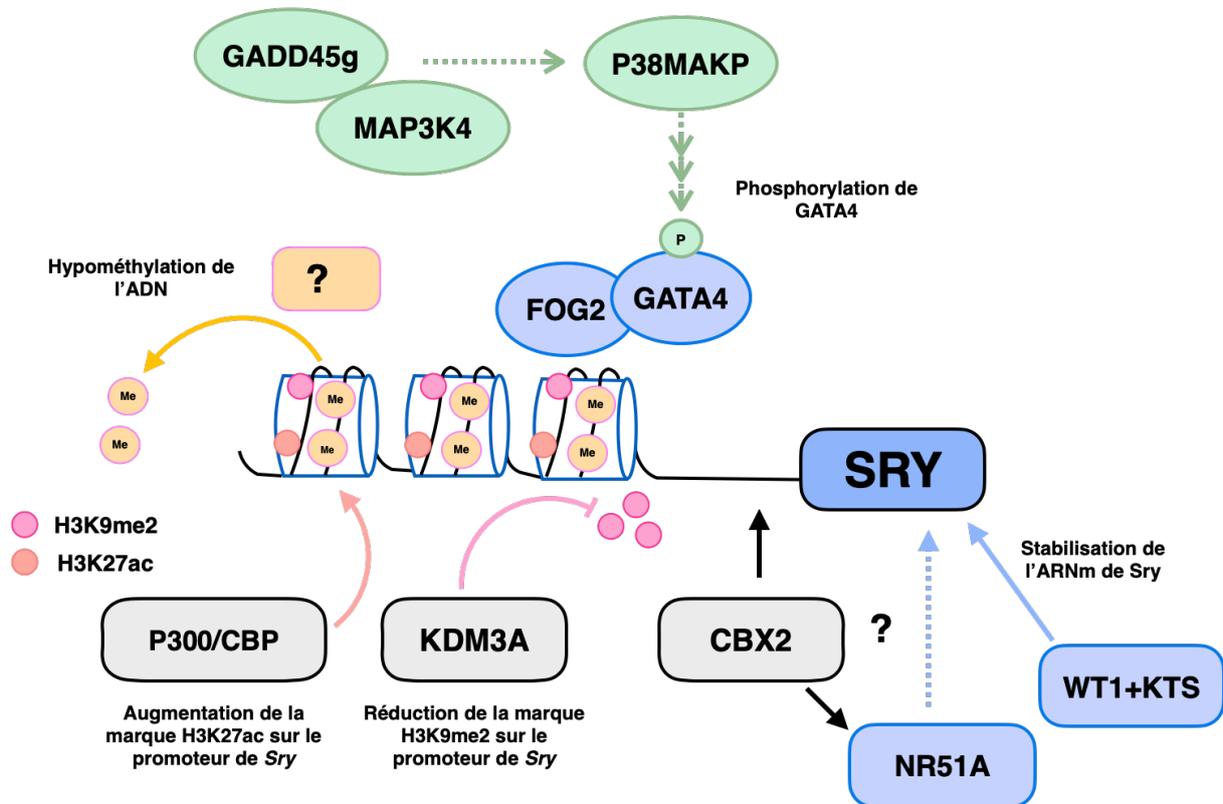


Figure 5 : Modèle de la régulation positive de *Sry*

Sry est hypométhylé durant sa fenêtre d'expression par des mécanismes qui restent à déterminer. *Sry* subit aussi un remplacement des marques épigénétiques répressives de la transcription au profit de marques permissives. On constate une réduction de la présence de la marque H3K9me2 sous l'action de KDM3A et une augmentation de la présence de H3K27ac grâce à l'action du complexe P300/CBP. Pour réguler l'expression de *Sry* à la hausse GATA4 doit être phosphorylé pour être actif. Cette activation est effectuée par une voie faisant intervenir plusieurs MAPK. GADD45g fixe et active MAP3K4 qui va, à son tour, activer la voie des p38 MAPK par phosphorylation pour permettre la phosphorylation de GATA4. De plus, GATA4 doit être associé à son cofacteur FOG2 pour se fixer au promoteur de *Sry* et l'activer. Puis, WT1+KTS pourrait être impliqué dans la stabilisation de l'ARNm de *Sry*. Enfin, CBX2 est impliqué dans la régulation positive de *Sry* par un mécanisme encore inconnu. En revanche, CBX2 interagit physiquement avec *Nr5a1* pour augmenter son expression.

Adapté de (Tanaka and Nishinakamura, 2014)

De la même manière, *Gadd45g* (growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 gamma) code une protéine de la famille des protéines de réponse au stress (stress-response protein). Son invalidation chez la souris provoque une diminution et un retard de l'expression de *Sry* conduisant à une inversion du sexe chez les mâles. Par ailleurs, chez les mutants *Gadd45g* la voie de signalisation des p38 MAPK est altérée (Gierl et al., 2012). L'invalidation de *Map3k4* (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4), acteur de la voie de signalisation des p38 MAPK, conduit au même phénotype que l'invalidation de *Gadd45g* (Bogani et al., 2009). De plus, la surexpression de *Map3k4* permet de restaurer un phénotype normal chez les animaux mutants pour *Gadd45g* (Warr et al., 2012). Enfin, il a été montré que *Gadd45g* est un régulateur direct de la voie des MAPK (Takekawa and Saito, 1998). Ces études ont permis de mettre en évidence une voie de régulation de *Sry*. En résumé, GADD45g active MAP3K4 qui va, à son tour, permettre la phosphorylation de GATA4. C'est la forme phosphorylée de GATA4 qui se fixe à *Sry* pour activer son expression (Gierl et al., 2012 ; Warr et al., 2012).

Chez les souris invalidées pour *Cbx2* on observe aussi une diminution de l'expression de *Nr5a1* et *Sry* provoquant une inversion du sexe chez les mâles. Ce phénotype peut être corrigé en surexprimant *Sry* chez les animaux mutants. Néanmoins, aucune interaction directe en CBX2 et *Sry* n'a été montrée (Katoh-fukui et al., 1998 ; Katoh-Fukui et al., 2005 ; Katoh-Fukui et al., 2012). Chez l'homme et le porc, NR5A1 est capable de se fixer sur le promoteur de *SRY* (de Santa Barbara et al., 2001 ; Pilon et al., 2003). Malheureusement, ces sites de fixations ne sont pas conservés chez la souris. Par contre, d'autres sites potentiels de fixation de NR5A1 ont été trouvés chez la souris. Il reste maintenant à savoir si les sites de fixation de NR5A1 sur *Sry* participent à la régulation de son expression et si CBX2 intervient dans cette régulation.

Des modifications épigénétiques sont aussi impliquées dans la régulation de l'expression de *Sry*, notamment la méthylation de l'ADN. En effet, durant la période d'activation de l'expression de *Sry* entre 10,50jpc et 12,50jpc, son promoteur est hypométhylé. En dehors de cette fenêtre d'expression et dans les tissus où *Sry* n'est pas exprimé il est hyperméthylé (Nishino et al., 2004). Des études ont montré que cette déméthylation pouvait être due à l'action de GADD45g, connu pour promouvoir la déméthylation de certains gènes (Barreto et al., 2007 ; Schüle et al., 2019). Mais l'invalidation de *Gadd45g* n'induit pas d'hyperméthylation de *Sry* (Gierl et al., 2012 ; Warr et al., 2012). Les mécanismes conduisant à l'hypométhylation de *Sry* durant son expression dans la gonade restent à élucider. Dans leur étude, Christof Niehrs et son équipe montrent aussi un enrichissement des marques d'histones activatrices de la transcription

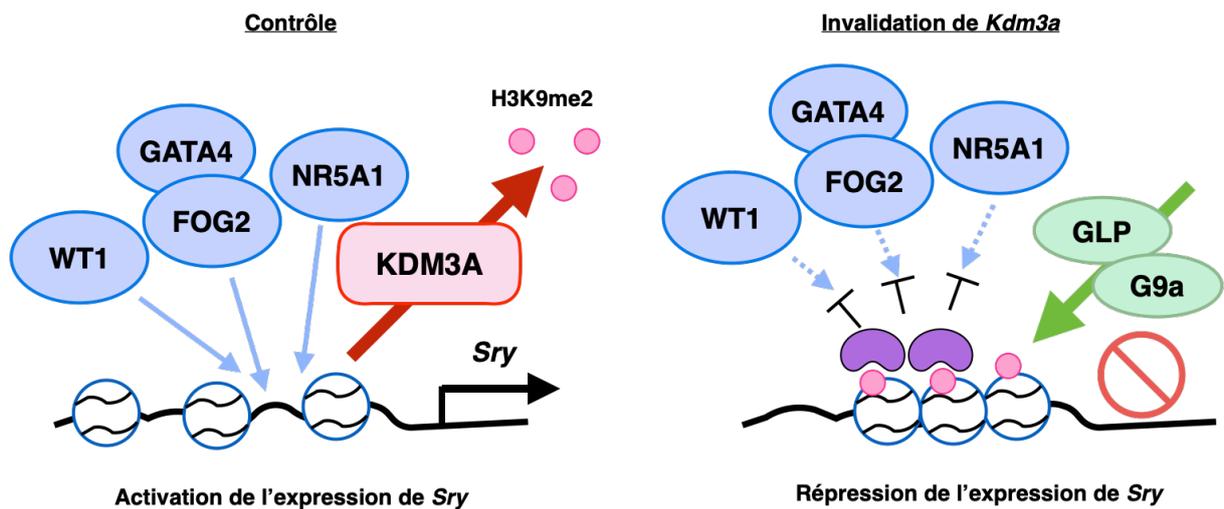


Figure 6 : Modèle d'action de KDM3A pour réguler l'expression de *Sry* chez la souris

En situation normale l'enzyme KDM3A (Lysine Demethylase 3A) est responsable de la déméthylation de H3K9m2 et permet l'accessibilité de la chromatine et par conséquent l'expression de *Sry*.

Lors de l'invalidation de *Kdm3a* le complexe GLP/G9a est responsable de la méthylation de H3K9 rendant la chromatine inaccessible aux facteurs de transcription permettant l'expression de *Sry*.

Adapté de (Kuroki et al., 2017)

comme H3K4me3. La présence de ces marques n'est pas affectée par l'inactivation de *Gadd45g* et leur mode de régulation reste inconnu à ce jour (Gierl et al., 2012).

Dans le même temps, durant l'expression de *Sry* on constate d'autres modifications des marques d'histone. Le gène *Kdm3a* (Lysine Demethylase 3A) (aussi appelé *Tsga*, *Jhdm2a* et *Jmjd1a*) code pour une enzyme responsable de la déméthylation de H3K9me2, marque réprimant la transcription. Lors de l'inactivation de *Kdm3a* chez la souris, on constate une augmentation de la présence de la marque H3K9me2 au niveau de *Sry* et une diminution de l'expression de *Sry* (Kuroki et al., 2013). Ce phénotype peut être restauré en administrant un inhibiteur du complexe GLP/G9a qui est responsable de la méthylation de H3K9 (Kuroki et al., 2017). Ces études ont permis de conclure que l'expression de *Sry* nécessite la déméthylation de H3K9me2 réalisée par KDM3A qui contrecarre l'action du complexe GLP/G9a (Figure 6).

Enfin, le complexe composé de deux histones acétyltransférases P300 et CBP (CREB binding protein) permet d'augmenter sur *Sry* la présence de la marque activatrice de la transcription H3K27ac. Ainsi, l'absence du complexe P300/CBP conduit à une diminution de l'expression de *Sry* et une inversion du sexe chez les mâles mutants (Carré et al., 2018).

b. SOX9 (SRY-Box Transcription Factor 9)

Une fois exprimé, SRY va réguler à la hausse l'expression de sa cible directe *Sox9* entre 11,00jpc et 11,50jpc. SOX9 (SRY-Box Transcription Factor 9) est un facteur de transcription faisant partie de la famille des « SRY-related HMG box » (Morais et al., 1996). Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN HMG et peut-être subdivisée en plusieurs sous-groupes. Les gènes *Sox* sont connus pour réguler le développement embryonnaire à plusieurs niveaux (Bowles et al., 2000). Avant 11,50jpc, *Sox9* est exprimé à un faible niveau basal par les précurseurs NR5A1-positifs indépendamment du sexe chromosomique (Zhao et al., 2018 ; Morais et al., 1996). Puis, c'est l'expression de *Sry* qui permet une augmentation importante de l'expression de *Sox9* chez le mâle. Comme pour l'initiation de l'expression de *Sry*, l'initiation de l'expression de *Sox9* ne se fait pas de manière homogène dans toute la crête génitale. Elle débute au centre des crêtes génitales pour s'étendre aux pôles antérieur et postérieur (Bullejos and Koopman, 2005). Plusieurs études ont mis en évidence que SRY régule l'expression de *Sox9* via différents mécanismes.

Premièrement, Sekido et Lovell-Badge ont généré un modèle de souris transgénique porteuse d'un chromosome artificiel bactérien comportant une portion de la séquence en amont et en aval du site d'initiation de transcription (TSS) de *Sox9* mesurant 120kb (kilobase). Grâce

au rapporteur *LacZ* aussi ajouté, ils ont pu suivre l'activité transcriptionnelle du transgène. Ainsi, ils ont mis en évidence l'existence d'une portion minimale suffisante pour récapituler l'expression de *Sox9* dans la gonade. Cette portion localisée à environ 10kb du TSS de *Sox9* a été nommée TES pour « Testis-specific Enhancer of *Sox9* ». Puis, ils ont identifié, toujours grâce à l'ajout du rapporteur *LacZ*, une région de 1,4kb en amont de *Sox9* qui est hautement conservée dans plusieurs espèces et qui a été nommée TESCO pour « TES core ». Ils ont alors montré que cet élément TESCO est suffisant pour activer l'expression de *Sox9*. Enfin, grâce à des expériences de ChiP, les auteurs ont montré que SRY et NR5A1 se fixent directement sur la séquence TESCO pour activer l'expression de *Sox9*. De plus, les données de ChiP montrent que SOX9 est aussi capable de se fixer sur la séquence TESCO. Ainsi, une fois que *Sry* n'est plus exprimé à 13,50jpc, SOX9 se fixe sur les sites anciennement occupés par SRY pour s'autoréguler (Sekido and Lovell-Badge, 2008). Plus récemment, la technologie CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) a permis de générer des modèles murins dans lesquels les régions TES ou TESCO sont absentes. Ces animaux XY présentent une diminution de l'expression de *Sox9* d'environ 50%, mais pas de phénotype d'inversion du sexe (Gonen et al., 2017). De manière logique, on observe le même phénotype chez les animaux hétérozygotes dont une copie de *Sox9* est invalidée (Bi et al., 2001 ; Chaboissier *et al.*, 2004 ; Barrionuevo et al., 2006 ; Lavery et al., 2011). En revanche l'invalidation d'une copie de *Sox9* et l'absence de la région TES provoquent une baisse de l'expression de *Sox9* de 80%, une diminution de l'expression d'*Amh* et entraîne la différenciation des gonades en ovotesticule exprimant *Foxl2* (Gonen et al., 2017). Ces études ont permis d'établir qu'en dessous du seuil de 20% d'expression de *Sox9*, une souris XY subira une différenciation partielle ou totale des gonades en ovaire. Enfin, chez la souris, l'absence des régions TES et TESCO n'induit qu'une diminution de 50% de l'expression de *Sox9* ce qui permet d'affirmer que SRY doit réguler l'expression de *Sox9* par d'autres mécanismes (Gonen et al., 2017). En revanche chez l'homme une diminution de 50% de l'expression de *SOX9* est suffisante pour générer une réversion du sexe chez les patients XY (Wagner et al., 1994). De la même manière, une duplication de *SOX9* provoque une inversion du sexe chez les patients XX (Huang et al., 1999).

Un second mécanisme a été mis en évidence en 2018 en utilisant les techniques d'ATAC-seq pour « Assay for Transposase-Accessible Chromatin » et de DNaseI-seq pour « Deoxyribonuclease I hypersensitive site sequencing » qui permettent d'étudier l'accessibilité de la chromatine. Les résultats de ces techniques ont été couplés avec des données de ChiP en utilisant un anticorps dirigé contre la marque d'histone H3K27ac, une marque activatrice de la transcription. Ensemble, ces données permettent d'identifier des régions où la chromatine est

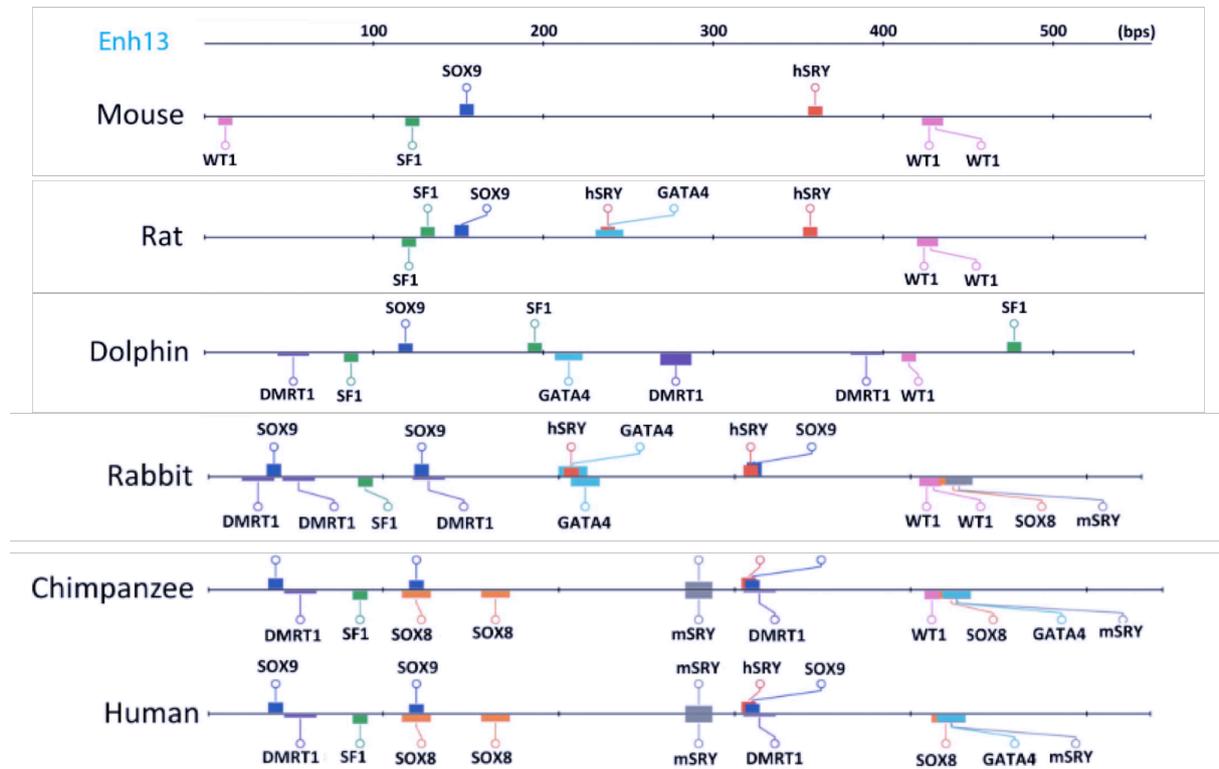


Figure 7 : Localisation des sites potentiels de liaison des facteurs de transcription dans Enh13 à travers l'évolution.

Prédiction des localisations des sites de fixations des facteurs de transcription liés à la détermination du sexe sur Enh13 dans différentes espèces.

Issu de (Gonen et al., 2018).

accessible et transcriptionnellement active. Ainsi, les auteurs ont découvert la présence d'une nouvelle région régulatrice de l'expression de *Sox9* appelée Enh13 (Enhancer 13). Enh13 mesure 557pb (paires de bases) et est situé à 565kb en amont du TSS de *Sox9*. Sa séquence est très conservée chez les mammifères et comporte plusieurs sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription (**Figure 7**). Son absence provoque une inversion de sexe chez les mâles avec les expressions de *Sox9* et *Foxl2* comparables à une gonade femelle contrôle. Pour savoir si SRY est capable de se fixer à Enh13, les auteurs ont réalisé des expériences de ChiP. Ils ont constaté que SRY se fixe préférentiellement à Enh13 à 11,50jpc plutôt qu'à TESCO. En revanche à partir de 13,50jpc, SOX9 se fixe à Enh13 autant qu'à TESCO. De plus, en l'absence de Enh13 on observe une augmentation de l'expression de *Sry*, indiquant que SOX9 est impliqué dans la régulation à la baisse de *Sry*. Ces données permettent de conclure que l'initiation de l'expression de *Sox9* est régulée par SRY via Enh13 plutôt que TESCO. Ainsi, l'absence de Enh13, ne permet pas une expression suffisante de *Sox9*, si bien que ses gènes cibles impliqués dans la différenciation des CS ne sont pas activés provoquant l'inversion du sexe. Par la suite, le maintien de l'expression de *Sox9* dépendra de la fixation de SOX9 sur TESCO et Enh13 à des niveaux comparables. Compte tenu du nombre important de sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription sur Enh13, il serait intéressant de savoir si NR5A1 ou d'autres facteurs de transcription entrent en jeu dans cette régulation (Gonen et al., 2018).

Une fois que l'expression de *Sry* est abolie, la maintenance de l'expression de *Sox9* est indispensable pour achever la différenciation des CS et la formation du testicule. Le maintien de l'expression de *Sox9* est possible grâce à deux autres boucles de régulation (**Figure 8**).

Une première boucle de régulation fait intervenir PTGDS (prostaglandin D synthase) aussi appelée L-PGDS ou PGDS et la prostaglandine D2 (PGD2). PTGDS est l'enzyme responsable de la production de PGD2. *Ptgds* est exprimé juste après *Sox9* et *Sry* à 11,75 jpc, en suivant la même dynamique d'expression, laissant penser à une possible régulation de *Ptgds* par SOX9 et SRY (Adams and McLaren, 2002). Finalement des études ont montré que seul SOX9 est capable de se fixer sous forme de dimère sur le promoteur de *Ptgds* et de l'activer (Wilhelm et al., 2007). Puis, il a été vu que l'ajout de PGD2 dans des cultures d'ovaire XX induit l'expression de *Sox9* et *Amh* (Adams and McLaren, 2002 ; Wilhelm et al., 2005). L'étude de Wilhelm a aussi mis en évidence que PGD2 agit comme un signal paracrine dans des cultures de testicules en recrutant des cellules SRY-négatives vers un destin Sertolien en leur permettant d'exprimer *Sox9* et *Amh* (Wilhelm et al., 2005). Par ailleurs, à partir de 11,50jpc, quand l'expression de *Sox9* augmente chez les mâles, SOX9 n'est plus détecté dans le cytoplasme des

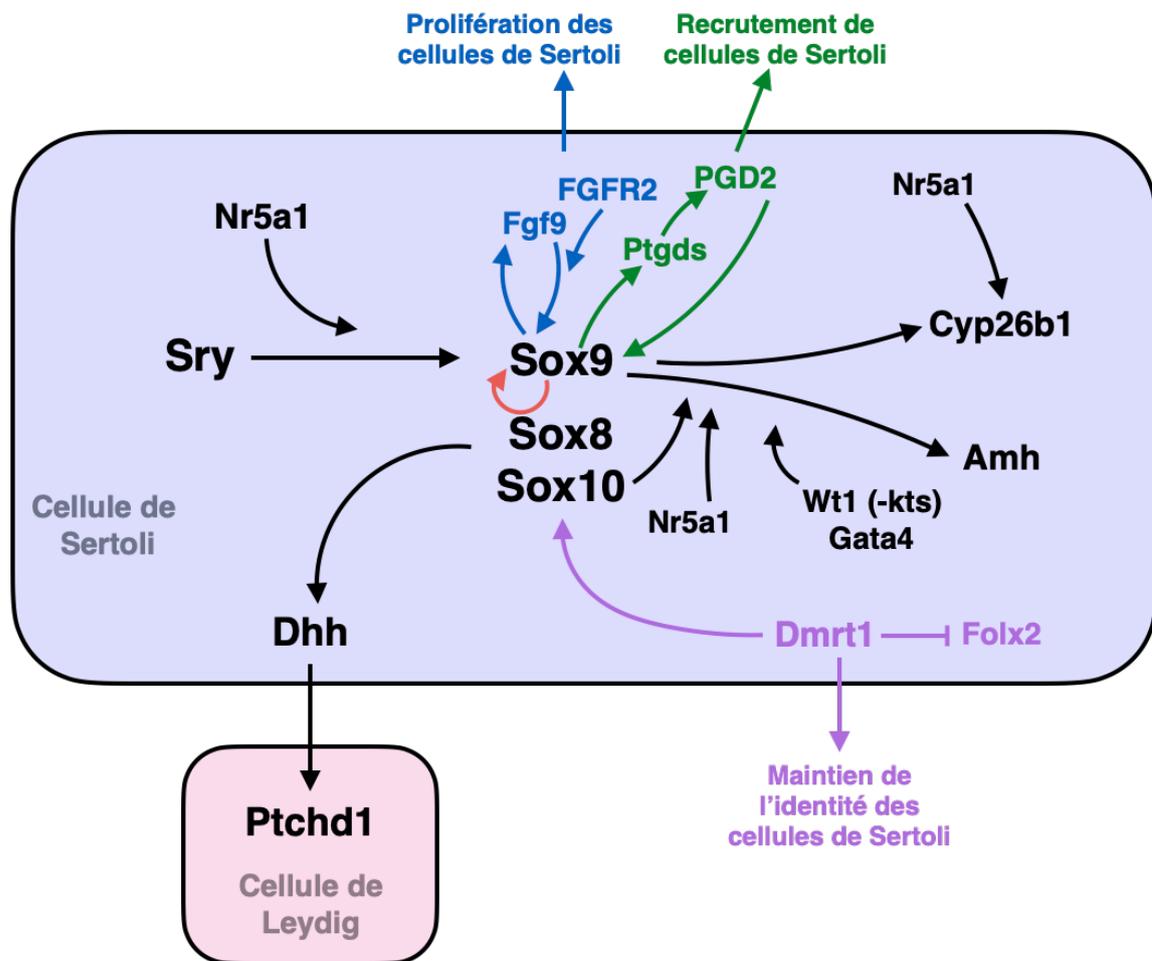


Figure 8 : Modèle moléculaire des interactions géniques dans le développement du testicule.

SRY et NR5A1 régulent ensemble l'expression de *Sox9*, puis déclenchent une cascade d'expression de gènes permettant le développement des testicules.

Sox9 maintient sa propre expression grâce à ses boucles de régulation faisant intervenir d'une part FGF9 et FGFR2 et d'autre part PTGDS et PGD2. FGF9 et FGFR2 sont aussi impliqués dans la prolifération des cellules de Sertoli alors que PTGDS et PGD2 sont nécessaires au recrutement de cellules SRY-négatives vers un destin Sertolien.

L'expression de *Sox9* permet aussi l'expression d'*Amh* et *Cyp26b1* à l'aide de ses partenaires. AMH intervient dans la régression des canaux de Müller et CYP26B1 dans le maintien des cellules germinales dans un état non méiotique. *Sox9* peut être compensé par d'autres membres de la famille des Sox à différents niveaux qui sont indispensables au maintien de l'identité masculine de la gonade. Après la détermination sexuelle, *Dmrt1* aura pour rôle de maintenir l'identité sexuelle masculine en antagonisant notamment *Folx2*.

Adapté de (She and Yang, 2017)

cellules et devient nucléaire (Zhao et al., 2018 ;Morais et al., 1996). L'équipe de Brigitte Boizet-Bonhoure a mis en évidence le mécanisme par lequel SOX9 est transporté vers le noyau. PGD2 est capable de se lier à deux récepteurs dont le récepteur DP1 (DP receptor associated to adenylylase and intracellular cAMP production). La liaison de PGD2 à DP1 permet la stimulation de la voie AMP-c qui active la protéine kinase A, responsable de la phosphorylation de SOX9. Puis, la forme phosphorylée de SOX9 sera prise en charge par l'importine-bêta pour être transportée dans le noyau (Malki et al., 2005). L'inactivation de *Ptgds* entraîne une baisse de l'expression de *Sox9* et sa localisation cytoplasmique ; le développement de la gonade est alors retardé. Néanmoins, à partir de 17,50jpc le retard de développement est rattrapé et les gonades des animaux mutants sont comparables à celles des animaux contrôles. Ces résultats suggèrent que PTGDS et PGD2 sont responsables en parti du maintien de l'expression de *Sox9* mais sont indispensables pour la différenciation sexuelle (Moniot et al., 2009).

La seconde boucle de régulation est indépendante de la boucle PTGDS/PGD2. Elle implique le facteur de croissance FGF9 (fibroblast growth factor) et son récepteur FGFR2 (fibroblast growth factor receptor) à activité tyrosine kinase (Kim et al., 2006). FGF9 et FGFR2 sont détectés très tôt dans le développement de la gonade. A 11,50jpc, *Fgf9* est présent dans les gonades femelles et mâles puis, à partir de 12,50jpc, il est exprimé uniquement dans les gonades mâles (Colvin et al., 2001 ; Schmahl et al., 2004). FGFR2 est détecté chez les deux sexes, à la surface des cellules à 11,00jpc puis, à partir de 11,50jpc il devient nucléaire dans les gonades mâles. Cette translocation nucléaire coïncide avec l'expression de *Sox9* dans la gonade mâle (Schmahl et al., 2004). L'inactivation de *Fgf9* ou *Fgfr2* chez les animaux XY provoque un phénotype sexuel similaire à savoir, une hypoplasie des gonades et une inversion du sexe, variable en fonction du fond génétique des souris. De plus, les animaux XY invalidés présentent une baisse de l'expression de *Sox9* et *Amh*, et une diminution de la prolifération des CS (Colvin et al., 2001 ; Schmahl et al., 2004 ; Kim et al., 2007). Néanmoins, ces études montrent aussi que FGF9 n'est pas nécessaire pour l'induction de l'expression de *Sox9*, mais plutôt pour son maintien (Colvin et al., 2001). De plus, l'inactivation *Sox9* influence à la baisse l'expression de *Fgfr2* et *Fgf9* ainsi que la localisation nucléaire de FGFR2 (Bagheri-Fam et al., 2008 ; Kim et al., 2006). Il a aussi été observé que l'ajout de FGF9 sur des cultures *in vitro* de gonade XX induit l'augmentation de l'expression de *Sox9* (Kim et al., 2006). Toutes ces études ont permis de conclure que SOX9 permet l'initiation de l'expression de FGFR2 et FGF9, qui participent ensuite au maintien de l'expression de *Sox9* et à la prolifération des CS (**Figure 8**).

Pour étudier le rôle central de *Sox9* durant la différenciation sexuelle et le développement du testicule plusieurs modèles murins ont été générés pour l'inactivation ou la surexpression de

Sox9. Pour commencer, il a été observé que l'inactivation d'une copie de *Sox9* ne provoque pas d'inversion du sexe chez les animaux XY (Bi et al., 2001). Puis, l'équipe d'Andreas Schedl a inséré un chromosome artificiel de levure permettant l'expression de *Sox9* sous le contrôle du promoteur *Wt1* dans les cellules somatiques de souris XX. D'autres modèles exprimant *Sox9* chez des souris XX via différentes techniques ont été générés et les auteurs de ces études sont arrivés à la même conclusion de l'équipe d'Andreas Schedl (Vidal et al., 2001 ; Bishop et al., 2000) : l'expression ectopique de *Sox9* chez une souris XX est suffisante pour induire le développement d'un système urogénital mâle. De la même manière, l'expression de *Sox9* en l'absence de *Sry* chez des souris XY est suffisante pour permettre un développement normal et la fertilité des souris (Qin and Bishop, 2005). Plus tard, des équipes ont développé des modèles invalidés pour *Sox9* en utilisant le système Cre-lox. Ce système leur a permis d'invalider *Sox9* dans un type cellulaire précis et à un moment défini. Ainsi, l'invalidation de *Sox9* dans les CS avant la différenciation sexuelle provoque une inversion complète du sexe chez les animaux XY qui présentent alors des ovaires partiellement fertiles (Barrionuevo et al., 2006)(Lavery et al., 2011). A l'inverse, l'invalidation de *Sox9* après la différenciation sexuelle n'empêche pas le développement normal des testicules dans lesquels les cordons séminifères sont formés. Néanmoins, à terme ces animaux sont stériles (Chaboissier et al., 2004a ; Barrionuevo et al., 2009). Ces études montrent que chez la souris, un certain seuil d'expression de *Sox9* pendant la différenciation sexuelle est essentiel, mais surtout suffisant, pour permettre le développement du testicule et la différenciation des CS.

c. Autres membres de la famille des Sox

La famille des gènes *Sox* est subdivisée en plusieurs groupes. *Sox9* appartient au groupe E avec *Sox8* et *Sox10* (Bowles et al., 2000). Les homologies de séquences entre ces trois membres posent la question de leur possible redondance fonctionnelle dans le cadre de la différenciation sexuelle et du développement des testicules. L'expression de *Sox8* et *Sox10* est détectée dans les cellules somatiques puis dans les CS à partir de 12,5jpc et 11,5jpc, respectivement (Polanco et al., 2009; Schepers et al., 2003).

Pour commencer, l'invalidation de *Sox8* ne provoque pas de phénotype testiculaire à la naissance mais une infertilité apparaît progressivement pour être totale à l'âge de 5 mois. A ce stade, les tubes séminifères présentent des vacuoles, moins de cellules germinales et l'épididyme contient des cellules germinales arrondies au lieu de spermatozoïdes (Sock et al., 2001 ; Bryan et al., 2008). Cette désorganisation progressive est causée par une dérégulation de

l'expression de la Claudine 3, une protéine responsable de la formation des jonctions serrées créées par les CS, une déstabilisation des microtubules et une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-testiculaire. D'ailleurs des expériences complémentaires ont révélé que SOX8 est capable de se fixer au promoteur de la *Cldn3* (Singh et al., 2013). Ce phénotype est comparable à celui provoqué par l'inactivation de *Sox9* après la différenciation sexuelle (Chaboissier et al., 2004a ; Barrionuevo et al., 2009). Ainsi, pour déterminer si SOX8 était capable de compenser l'action de SOX9, des équipes ont généré des modèles murins invalidés pour *Sox9* et *Sox8* simultanément. Quand l'inactivation a lieu avant la différenciation sexuelle, les souris présentent un phénotype plus sévère que lors de l'inactivation de *Sox9*. En effet, cette double inactivation provoque la perte des CS et des CL ainsi qu'une inversion du sexe chez les animaux XY (Chaboissier et al., 2004b). De la même manière, la double inactivation après la différenciation sexuelle, aggrave le phénotype observé lors d'une simple inactivation de *Sox9*. Les tubes séminifères sont absents à la naissance, les gonades n'expriment plus *Amh* mais des gènes pro-ovariens, et le système uro-génitale est féminisé (Barrionuevo et al., 2009). Les auteurs expliquent que SOX9 et SOX8 sont nécessaires pour maintenir l'expression de *Dmrt1*. En effet, en l'absence de SOX9 et de SOX8, l'expression de *Dmrt1* diminue conduisant à l'augmentation de l'expression de *Foxl2* et donc à la féminisation du testicule avant la mort des CS et la dégénérescence de la gonade (Barrionuevo et al., 2016). De plus, SOX8 est capable *in vitro* d'interagir directement avec NR5A1 sur le promoteur de *Amh* pour activer son expression, comme SOX9 (Schepers et al., 2003). Toutes ces données suggèrent que *Sox9* est essentiel avant la différenciation sexuelle mais que *Sox8* est capable de compenser certaines de ses fonctions. Par contre, après la détermination du sexe, *Sox9* et *Sox8* sont nécessaires pour permettre le développement normal du testicule et la création d'un environnement favorable à la spermatogénèse.

Sox10 quant à lui est d'abord exprimé à un faible niveau dans les deux sexes à 10,50jpc, puis il n'est détecté que dans le noyau des CS à partir de 11,50jpc. L'expression ectopique de *Sox10* chez des souris XX provoque une inversion complète du sexe. L'expression de *Foxl2* est diminuée alors que les expressions de *Ptgds*, *Sox9* et *Amh* sont augmentées. *In vitro* les auteurs ont montré que SOX10 est capable d'activer le promoteur d'*Amh* en partenariat avec NR5A1. SOX10, toujours avec NR5A1, est aussi capable d'activer TESCO d'une manière plus importante que SRY mais moins important que SOX9 (Polanco et al., 2009). Cette étude permet de penser que *Sox10* a un rôle dans la différenciation sexuelle. Néanmoins, bien que l'expression ectopique de *Sox10* induise une inversion du sexe chez des animaux XX il est

possible que son invalidation chez des animaux XY avant la différenciation sexuelle n'entraîne pas de phénotype d'inversion sexuelle.

Dans la famille des gènes *Sox*, *Sox3* fait partie du groupe B1. De la même manière que *Sox10*, l'expression ectopique de *Sox3* chez des souris XX provoque une inversion complète du sexe. Toujours comme SOX10, SOX3 est capable d'activer TESCO en partenariat avec NR5A1 (Sutton et al., 2011). Par contre, l'invalidation de *Sox3* ne provoque pas de phénotype visible à la naissance. Adultes, les animaux mutants présentent une hypofertilité et une réduction globale de leur poids (Weiss et al., 2003).

Dans le groupe C, on retrouve *Sox4* qui est fortement exprimé dans les cellules somatiques des gonades dans les deux sexes. Son invalidation chez le mâle provoque un allongement de la gonade et une augmentation du nombre de codons séminifères. Chez ce mutant les cellules germinales présentent une surexpression des gènes de pluripotence et une diminution de l'expression des gènes de différenciation comme *Nanos2* et *Dnmt3l*. De plus, il a été montré que SOX4 est capable de moduler à la baisse l'expression de *Sox9* en se fixant à son élément de régulation TESCO. Les autres membres du groupe C à savoir *Sox11* et *Sox12* sont aussi capables d'influencer l'expression de *Sox9* mais de manière moins importante (Zhao et al., 2017).

Les fonctions exactes de chaque gène *Sox* dans le contexte du développement testiculaire normal sont compliquées à appréhender. En effet, les études montrent que les gènes SOX sont exprimés au même moment, par les mêmes cellules, et peuvent partager les mêmes cibles. Ces redondances fonctionnelles permettent d'amplifier et soutenir l'activation de l'expression des gènes pro-testiculaires.

d. *Dmrt1* (Dsx and Mab-3-related Transcription factor 1)

DMRT1 (Dsx and Mab-3-related Transcription factor 1) est un facteur de transcription exprimé dans les gonades bipotentes XX et XY à partir de 10,50jpc et jusqu'à 13,50jpc. Ensuite, l'expression de *Dmrt1* présente un dimorphisme sexuel : *Dmrt1* est plus fortement exprimé chez le mâle dans les CS et les cellules germinales (De Grandi et al., 2000 ; Raymond et al., 2000 ; Lei et al., 2007). La surexpression de *Dmrt1* dans des gonades fœtales de souris XX provoque une inversion du sexe. Après la naissance, les animaux présentent un système urogénital masculin. De plus, les gonades n'expriment plus les gènes spécifiques des cellules de la granulosa à savoir *Foxl2* et *Wnt4* mais expriment *Sox9* qui est un marqueur spécifique des CS. Dans ce cadre, *Dmrt1* est capable d'induire la différenciation masculine d'une gonade XX

en l'absence de *Sox9* et *Sry* (Lindeman et al., 2015 ; Zhao et al., 2015). De manière surprenante, l'inactivation de *Dmrt1* chez des souris XY n'a pas d'effet sur le développement de la gonade au stade embryonnaire. En revanche, après la naissance, on observe une reprogrammation des cellules somatiques. Cette reprogrammation se manifeste par une baisse de l'expression des gènes considérés comme « pro-testiculaire » à savoir *Sox8*, *Sox9* et *Ptgds* au profit de gènes pro-ovariens comme *Foxl2*, *Ers1*, *Ers2*, *Wnt4* et *Rspo1* (Matson et al., 2011 ; Raymond et al., 2000). De plus, les CS ne cessent de proliférer, ne se polarisent pas et ne présentent pas de jonctions serrées (Raymond et al., 2000 ; Fahrioglu et al., 2006). Dans le même temps, les cellules germinales ne parviennent pas à réaliser la méiose et meurent progressivement (Fahrioglu et al., 2006). Dans un contexte normal, DMRT1 est capable d'inhiber l'expression de *Foxl2* chez le mâle pour empêcher les CS de se reprogrammer en cellule de la granulosa. Dans ce sens, il a été montré que DMRT1 se fixe sur des séquences proches des gènes spécifiques des cellules de la granulosa qui sont notamment : *Foxl2*, *Ers1*, *Ers2* et *Wnt4* (Matson et al., 2011). Pour conclure, ces études montrent que *Dmrt1* est dispensable pour initier et réaliser la différenciation sexuelle chez le mâle, qui se déroule normalement en son absence. En revanche, *Dmrt1* a un rôle important dans le maintien de l'identité masculine après la naissance.

e. *Amh* (Anti-Müllerian Hormone)

AMH (Anti-Müllerian Hormone) aussi appelée MIS (Müllerian Inhibiting Substance) est une hormone de la super-famille des TGF- β (Transforming Growth Factor- β). *Amh* est exprimé par des CS dans la gonade masculine peu de temps après *Sox9*, à partir de 12,50jpc (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991 ; Behringer et al., 1994). AMH est responsable de la régression des canaux de Müller durant le développement embryonnaire, entre 13,50jpc et 14,50jpc (Gao et al., 2006). Son inactivation complète, comme celle de son récepteur *Amhr2* (Müllerian Inhibiting Substance Receptor II), provoque une persistance des dérivés des canaux de Müller. Ainsi, en plus d'un système urogénital masculin, les animaux XY possèdent aussi un utérus, un vagin et un oviducte. Par contre, l'inactivation d'une seule copie ne provoque pas de phénotype, indiquant que 50% de l'expression d'*Amh* ou de son récepteur sont suffisantes pour permettre la régression totale des canaux de Müller (Behringer et al., 1994 ; Mishina et al., 1996 ; Bouchard et al., 2019). L'expression d'*Amh* est permise par SOX9 et NR5A1 qui ensemble se fixent sur son promoteur pour l'activer (Shen et al., 1994 ; Giuili et al., 1997 ; De Santa Barbara et al., 1998 ; Arango et al., 1999). De la même manière, SOX10 et SOX8 sont

aussi capables d'activer la transcription d'*Amh* en coopération avec NR5A1 (Schepers et al., 2003 ; Polanco et al., 2009 ; Barrionuevo et al., 2009). L'isoforme -KTS de WT1 est aussi impliquée dans cette régulation en interagissant directement avec NR5A1. Par ailleurs, en l'absence de l'isoforme -KTS ou dans le contexte du syndrome de Denys-Drash, NR0B1 (DAX1, dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1) qui est un acteur pro-ovarien remplace l'isoforme -KTS pour interagir avec NR5A1 et empêcher l'expression d'*Amh* (Nachtigal et al., 1998). Plus tard, il a été montré que GATA4 peut aussi activer l'expression d'*Amh* en coopération avec NR5A1 ou l'isoforme -KTS (Tremblay et al., 2001a ; Miyamoto et al., 2008). Ainsi, lors de l'inactivation par la technologie CRISPR/Cas9 du motif de fixation de GATA4 sur le promoteur d'*Amh* on constate une diminution significative de l'expression d'*Amh* au niveau transcriptionnel et protéique. Néanmoins, bien que significative, cette diminution n'a pas été suffisante pour induire la persistance des canaux de Müller et une féminisation du tractus génital (Bouchard et al., 2019). Pour conclure, il est important de noter que ces études ont relevé que seul SOX9 est indispensable pour l'initiation de l'expression d'*Amh*. Ainsi, les autres acteurs impliqués dans la régulation seraient plutôt des modulateurs agissant de manière complémentaire pour réguler la dose d'AMH produite (Arango et al., 1999 ; Tremblay et al., 2001a).

f. *Dhh* (Desert hedgehog)

DHH (Desert hedgehog) fait partie de la famille des protéines Hedgehog. *Dhh* est exprimé par les pré-CS à partir de 11,50jpc, juste après l'activation de l'expression de *Sry* (Bitgood et al., 1996). Son récepteur PTCH1 (Patched 1) est exprimé à partir de 12,50jpc à la surface des cellules interstitielles, c'est-à-dire les cellules de Leydig fœtales (CLF) et les cellules myoïdes périvitubulaires (Yao et al., 2002). L'inactivation de *Dhh* provoque une désorganisation des tubes séminifères et un défaut de différenciation des CLF conduisant à la réduction de la taille des testicules. En effet, chez ces animaux les CLF sont presque totalement absentes et le petit nombre de CLF restantes n'expriment pas ou faiblement leurs marqueurs spécifiques. De plus, 90% des animaux invalidés pour *Dhh* présentent un phénotype féminisé dans lequel la descente des testicules n'a pas eu lieu (Bitgood et al., 1996 ; Clark et al., 2000 ; Pierucci-Alves et al., 2001 ; Yao et al., 2002). Enfin, l'expression ectopique de *Dhh* chez des animaux XX permet l'apparition de CLF visiblement fonctionnelles car capables d'induire la descente des ovaires chez ces animaux (Barsoum et al., 2009). Ces données mettent en évidence l'importance des pré-CS et des CS dans la différenciation des autres types cellulaires composant le testicule.

g. *Wt1* (Wilm's tumor suppressor 1)

Comme décrit précédemment, *Wt1* est exprimé très tôt durant le développement de la gonade bipotentielle. Pendant et après la différenciation sexuelle, *Wt1* est normalement exprimé dans les pré-CS puis les CS. L'inactivation de *Wt1* à plusieurs stades du développement a permis de déterminer le rôle de WT1 avant ou après la différenciation sexuelle. Ainsi, lorsque *Wt1* est invalidé dans les CS entre 13,50jpc et 14,50jpc, les animaux présentent un défaut d'organisation des tubes séminifères à partir de 15,50jpc, la perte d'expression de *Sox9*, *Sox8* et *Amh* et une perte progressive des CS et des CG. Dans le même temps, un certain nombre de CS expriment *Hsd3b1* (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) qui est un marqueur spécifique des CL impliqué dans la stéroïdogénèse (Gao et al., 2006 ; Zhang et al., 2015). Par ailleurs, l'équipe de Fei Gao a mis en culture des CL de souris âgées de 21 jours surexprimant artificiellement *Wt1*. Après 48 heures de culture dans ces conditions, les CL expriment des gènes spécifiques des CS comme *Sox9*, *Amh* ou *Ptgds* au lieu des gènes spécifiques de la stéroïdogénèse comme *Hsd3b1* ou *Cyp19a1* (Zhang et al., 2015). Ces études permettent de conclure que WT1 est nécessaire pour maintenir l'expression de *Sox9* en l'absence de *Sry*, mais aussi que *Wt1* est indispensable à la survie et au maintien de l'identité des CS après la différenciation sexuelle. En plus de permettre une meilleure compréhension du rôle de *Wt1* avant et après la différenciation sexuelle, ces études constituent une preuve de plus que les CL et les CS partagent les mêmes précurseurs.

Plus tard, l'équipe de Fei Gao a développé un nouveau modèle murin invalidé pour *Wt1* à partir de 10,50jpc environ, c'est-à-dire avant la différenciation sexuelle. Chez les animaux mutants XY, ils observent une baisse importante de l'expression de *Sry* et d'autres marqueurs Sertoliens comme *Sox9*, *Amh* ou *Fgf9* au profit de gènes pro-ovariens comme *Wnt4*, *Rspo1* ou *Foxl2*. Par ailleurs, dans un contexte normal *Nr5a1* est exprimé fortement dans les CL et faiblement dans les CS. L'inactivation de *Wt1* a conduit à une surexpression de *Nr5a1* dans les CS à un niveau comparable à celui des CL. En plus d'une surexpression de *Nr5a1*, les CS déficientes pour *Wt1* se mettent aussi à exprimer *Hsd3b1*. Des expériences de ChiP ont mis en évidence que WT1 est capable de se fixer sur le promoteur de *Nr5a1* pour réguler son expression. Ainsi, les auteurs proposent qu'avant la différenciation sexuelle, WT1 réprime l'expression de *Nr5a1* dans les pré-SC pour les empêcher de se différencier en cellules stéroïdogènes exprimant *Hsd3b1* (Chen et al., 2017).

De manière surprenante, l'inactivation de *Wt1* après la différenciation sexuelle provoque l'apparition de cellules positives pour HSD3B1 mais dont l'expression de NR5A1 reste inchangée. Il est envisageable que ce résultat soit expliqué par le fait que NR5A1 est détecté par immunohistochimie un jour après l'inactivation de *Wt1* aussi il serait intéressant de vérifier que l'expression de *Nr5a1* n'est finalement pas affectée à un stade plus avancé (Gao et al., 2006). Enfin, il a aussi été montré que WT1 coopère avec LHX9 qui est capable *in vitro* de réguler directement et positivement l'expression de *Nr5a1* à des stades précoces du développement de la gonade bipotentielle (Wilhelm and Englert, 2002). Ainsi, en fonction du type cellulaire et du stade où il est exprimé, WT1 pourrait avoir des fonctions différentes en réprimant ou en promouvant l'expression de *Nr5a1*.

h. Nr5a1 (steroidogenic factor 1)

Dans un premier temps, c'est son rôle comme facteur de transcription régulant les gènes impliqués dans la stéroïdogénèse qui a été le plus étudié (Morohashi et al., 1992 ; Morohashi and Omura, 1996). Puis plus tard, certaines des études laissent penser que son niveau d'expression est déterminant pour la différenciation des cellules somatiques en cellules stéroïdogènes ou en CS. En effet, *Nr5a1* est exprimé très tôt par les précurseurs des cellules somatiques de la gonade. Ainsi, lors de l'inactivation de *Pod1*, l'expression de *Nr5a1* augmente fortement ce qui provoque l'augmentation du nombre de cellules stéroïdogènes (Cui et al., 2004). L'inactivation de *Wt1* provoque aussi une augmentation de l'expression de *Nr5a1* et conduit au même phénotype (Chen et al., 2017). Ces études montrent que le niveau d'expression de *Nr5a1* a une importance primordiale dans le devenir des cellules somatiques de la gonade avant la différenciation sexuelle.

Par ailleurs, on sait que l'inactivation de *Nr5a1* avant la différenciation sexuelle conduit à une absence de gonade (Luo et al., 1994). Néanmoins, son rôle après la différenciation sexuelle dans les CS reste peu investigué. Récemment l'équipe de Pancharatnam Jeyasuria a créé un modèle murin invalidé sur *Nr5a1* uniquement dans les CS à partir de 14,50jpc. Les auteurs constatent une baisse de l'expression de *Sox9*, d'*Amh*, une diminution de la prolifération des CS et une augmentation de l'apoptose. Par ailleurs, ils observent une diminution de l'expression de MDM2 (Murine Double Minute 2) et une augmentation de la présence de la forme active phosphorylée de la protéine TRP53 (transformation related protein 53). MDM2 est connu pour son activité d'ubiquitylation conduisant à la dégradation des protéines cibles dont TRP53 fait partie. D'autre part, la phosphorylation de TRP53 conduit à l'apoptose des cellules (Haupt et

al., 1997 ; Arnold J. Levine, 1997 ; Haupt et al., 1997). Ainsi, les auteurs proposent que NR5A1 régule l'expression de *Mdm2* à la hausse. Puis, MDM2 se lie à TP53 pour induire sa dégradation et bloquer son activité transcriptionnelle afin de permettre la survie des CS (Anamthathmakula et al., 2019). De plus, dans une autre étude l'équipe de Philippe Monget avait montré que l'invalidation de *Mdm2* uniquement dans les CS provoque un phénotype similaire (Fouchecourt et al., 2016). Ainsi, ces études placent NR5A1 comme facteur indispensable à la survie des CS via un mécanisme dépendant de *Mdm2* et *Tp53*.

B. Les cellules de Leydig fœtales / adultes

Les cellules de Leydig (CL) sont des cellules stéroïdogènes du testicule responsables de la production d'androgènes. Elles sont localisées entre les cordons séminifères dans l'espace interstitiel. On distingue deux populations de CL, les cellules de Leydig fœtales (CLF) et les cellules de Leydig adultes (CLA). Chez la souris, les CLF se différencient à partir de 12,50jpc alors que les CLA apparaissent après la naissance (Kerr and Knell, 1988 ; Yao et al., 2002).

Les CLF produisent majoritairement de l'androstènedione car elles n'expriment pas l'enzyme nécessaire à la dernière étape de synthèse de la testostérone codée par le gène *Hsd17b3* (17 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase 3). Durant la période fœtale, l'androstènedione produite par les CLF est transférée aux CS qui expriment *Hsd17b3* pour permettre la synthèse de testostérone (O'Shaughnessy et al., 2000 ; Shima et al., 2013). Durant cette période, les CLF, grâce aux androgènes qu'elles produisent, sont garantes du bon développement du tractus urogénital et notamment de la différenciation de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate ou encore du pénis (Drews, 2000 ; Morohashi et al., 2013). Les CLF expriment aussi *Insl3* (insulin-like hormone) un membre de la superfamille de l'insuline. L'invalidation de *Insl3* chez la souris conduit à la cryptorchidie, c'est-à-dire l'absence de descente des testicules dans le scrotum (Nef and Parada, 1999).

Par ailleurs, il est maintenant démontré que les CLF ne disparaissent pas après la naissance. En effet, grâce à l'utilisation de rapporteur transgénique il a été possible de suivre le devenir des CLF chez la souris. Ainsi, plusieurs équipes ont montré qu'à l'âge adulte les CLF sont toujours présentes (Kaftanovskaya et al., 2015 ; Shima et al., 2015).

Après la naissance, les CLA apparaissent et sont capables de produire de la testostérone de manière autonome sous l'influence de l'hormone lutéinisante (LH) produite par l'hypophyse. L'invalidation du récepteur de la LH (*Lhr*) ou l'invalidation de la sous bêta de la LH provoquent une diminution de la production de testostérone par les CLA. Néanmoins, ces invalidations n'ont pas d'effet sur la présence et la fonction des CLF dans la période de masculinisation fœtale. Ces observations ont permis aux auteurs de conclure que seules les CLA sont sensibles à la LH (Lei et al., 2001 ; Zhang et al., 2001 ; Ma et al., 2004).

L'origine des CLF et des CLA est débattue depuis de nombreuses années. Récemment l'équipe de Serge Nef a montré grâce à des analyses de scRNA-seq que les CS et les CLF émergent à partir des mêmes précurseurs NR5A1-positifs mais avec des cinétiques d'apparition

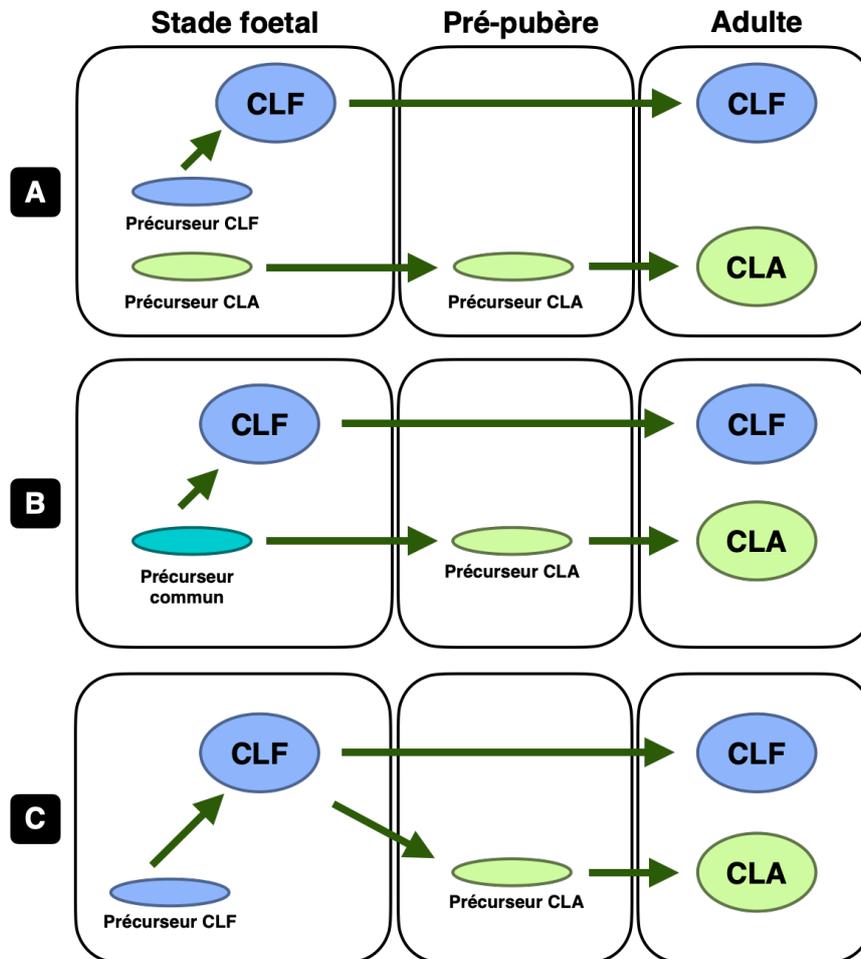


Figure 9 : Modèles proposés pour le développement des cellules de Leydig.

Trois modèles principaux de développement de cellules de Leydig ont été proposés.

(A) Les CLF se différencient de leurs précurseurs dans le testicule fœtal. Une autre population de précurseurs (précurseurs CLA) commence à se différencier en CLA au stade pré-pubère. Des études récentes ont confirmé que les CLF ne disparaissent pas mais persistent dans les testicules postnataux.

(B) Il existe un groupe de précurseurs commun de CL dans les testicules fœtaux. Cette population se différencie à la fois en CLF et en CLA, bien que l'on ne sache toujours pas par quel mécanisme se fait le choix de leur destinée.

(C) Les CLF proviennent de précurseurs spécifiques dans les testicules fœtaux. Une partie des CLF se différencie au stade néonatal puis commencent à se redifférencier au stade pré-pubère pour devenir des CLA dans le testicule adulte.

Adapté de (Svingen and Koopman, 2013) (Shima, 2019)

différentes (Stévant et al., 2018). De plus, l'augmentation du nombre de CLF se fait par différenciation des précurseurs et non par division mitotique des CLF (Miyabayashi et al., 2013). A partir de ces données, la question est de savoir si les CLF et les CLA partagent les mêmes précurseurs et si les CLF ont une influence sur la différenciation des CLA. Les modèles proposés dans la revue de Shima sont présentés dans la **Figure 9**. La première hypothèse est que les CLF et les CLA émergent de précurseurs différents durant la période foetale pour les CLF et durant la puberté pour les CLA (Ge et al., 2006 ; Inoue et al., 2016). La seconde hypothèse est que les CLF et les CLA partagent les mêmes précurseurs qui se différencient à des stades différents. Le choix de leur destinée entre CLF et CLA se fait par des mécanismes qui restent encore inconnus (Barsoum et al., 2013). L'hypothèse la plus récente est qu'à partir de la puberté une partie des CLF se différencie pour participer à l'émergence de la plupart, sinon la totalité des CLA (Shima et al., 2018).

A ce jour, il a été montré que des événements ayant lieu durant la vie foetale ont une influence sur la différenciation, l'activité et le nombre de CLA à l'âge adulte.

L'invalidation totale, ou uniquement dans les CLF et leurs précurseurs, du récepteur des androgènes codé par le gène *Ar* (Androgen receptor) constitue un bon exemple. A la naissance, ces souris présentent une diminution du nombre de CLA qui ne se différencie pas complètement, une diminution de la fertilité et une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des CL à l'âge adulte. Ainsi, une carence en androgène durant la période foetale ne permet pas la différenciation normale des CLA. L'équipe de Richard Sharpe propose que cette carence en androgènes provoque des modifications épigénétiques dans les précurseurs des CLA ce qui engendre une baisse de l'expression des protéines régulant la stéroïdogénèse, indispensables à la différenciation des CLA. De plus, ces études ont permis de démontrer que les cellules myoïdes péritybulaires ne sont pas les précurseurs des CL. En effet, malgré l'invalidation de l'*Ar* dans les cellules myoïdes péritybulaires, les CL continuent d'exprimer l'AR (Kilcoyne et al., 2014 ; Kaftanovskaya et al., 2015).

A la même période, l'équipe de Ken-Ichirou Morohashi a généré un modèle murin invalidé pour l'*Ar* dans les CLF uniquement et non dans leurs précurseurs (Shima et al., 2015). Cette invalidation n'induit pas de phénotype pathologique sur le développement des testicules ni sur l'expression des marqueurs spécifiques des CLF contredisant l'étude de Kaftanovskaya *et al.* Ces données permettent de conclure que les CLF qui persistent à l'âge adulte sont indépendantes des androgènes et constituent une sous population de CL. Dans cette étude, l'équipe de Ken-Ichirou Morohashi propose des hypothèses pour expliquer les différences entre

leurs résultats et ceux de Kaftanovskaya et *al.*, D'abord la recombinaison Cre utilisée par l'équipe de Kaftanovskaya et *al.*, pourrait aussi en partie exciser dans les précurseurs des CLA compromettants la bonne différenciation des CLA. Aussi, il a été mis en évidence que les précurseurs des CLF peuvent avoir une influence sur les précurseurs des CLA (Barsoum et al., 2013). Ainsi, en excisant dans les CLF et leurs précurseurs il est possible que les précurseurs des CLA soient aussi affectés.

De la même manière, la voie de signalisation Hedgehog (Hh) est impliquée dans la différenciation des précurseurs NR5A1-positifs en CLF. Dans un contexte normal, Hung-Chang Yao et son équipe proposent que, sous l'influence de cette voie, une partie des précurseurs NR5A1-positifs se différencient en CLF alors qu'une autre partie reste indifférenciée. Les auteurs observent que la suractivation de cette voie dans les précurseurs NR5A1-positifs provoque une augmentation du nombre de CLF, une diminution du nombre de précurseurs NR5A1-positifs et de CLA avant la puberté. Cette étude a permis de montrer que la modification d'une voie de signalisation dans une population de précurseurs durant la période fœtale influence la dynamique de différenciation des CL à l'âge adulte en affectant également la spermatogénèse (Barsoum et al., 2013).

L'implication d'un certain nombre de facteurs de transcription a aussi été mise en évidence dans la différenciation des CLF :

- POD1 qui est exprimé dans les cellules interstitielles. Son invalidation provoque une augmentation importante de l'expression de *Nr5a1* ce qui induit une augmentation du nombre de CLF. Dans ce cadre, POD1 peut être considéré comme un régulateur négatif de la voie de différenciation des CLF. La manière dont POD1 régule l'expression de *Nr5a1* reste encore à élucider car aucun site de fixation de POD1 sur *Nr5a1* n'a pu être mis en évidence à ce jour (Cui et al., 2004).

- ARX (Aristaless related homeobox gene) dont les mutations provoquent chez les patients des malformations des organes génitaux (Kato et al., 2004). La récapiutulation de cette maladie appelée XLAG (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia) chez l'homme, a été obtenue en invalidant le gène *Arx* chez la souris. Cette invalidation provoque une diminution du nombre de CLF (Kitamura et al., 2002). L'équipe de Ken-Ichirou Morohashi observe que *Arx* est préférentiellement exprimé dans les précurseurs des CLF et que son expression diminue proportionnellement au niveau de différenciation des CLF. Ainsi, l'expression d'*Arx* permet le maintien des

précurseurs des CLF et serait ensuite dispensable une fois leur différenciation achevée (Miyabayashi et al., 2013).

- NR0B1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1, aussi appelé DAX1) est impliqué dans la différenciation des CLF. Chez la souris, l'inactivation de *Nr0b1* provoque des phénotypes variables en fonction du fond génétique utilisé. Dans un fond génétique *Mus domesticus poschiavinus* on observe une réversion sexuelle des mâles (Meeks et al., 2003a ; Park et al., 2008). Par contre, dans un fond génétique *Mus musculus 129/SvJ* on observe une diminution du nombre de CLF et des cellules myoïdes périvitubulaires ainsi qu'une désorganisation des cordons séminifères (Meeks et al., 2003b). *In vitro* il a été vu que NR0B1 antagonise l'action de NR5A1. Larry Jameson et son équipe se sont alors demandé si l'inactivation de *Nr0b1* était capable de compenser la perte d'un allèle de *Nr5a1*. Pour étudier l'effet de ces invalidations sur le développement des CLF les auteurs ont analysé les niveaux d'expression de *Cyp17* et *Cyp11a1*, des marqueurs spécifiques des CLF. Lors de l'inactivation d'une copie de *Nr5a1*, l'expression de *Cyp17* et *Cyp11a1* diminue à 13,50jpc. Cette diminution est amplifiée par l'inactivation simultanée de *Nr0b1*, preuve que la perte de *Nr0b1* ne compense pas la perte d'une copie de *Nr5a1*. De même, l'inactivation d'une copie de *Nr5a1* induit une diminution de l'expression de *Dhh* et *Amh* à 11,50jpc, et ces derniers ne sont plus détectés chez les doubles mutants *Nr5a1 Nr0b1*. Ce résultat indique que, dans ce contexte, *Nr0b1* et *Nr5a1* peuvent aussi agir ensemble pour induire l'expression de *Dhh* et *Amh*. Toutefois, il est important de noter que les défauts d'expression de *Cyp17* et *Cyp11a1* sont restaurés à 14,50jpc et à 12,50jpc pour *Dhh* et *Amh*. Ainsi, la coopération de *Nr0b1* et *Nr5a1* n'est pas indispensable au développement des CLF ni de la gonade bien que leurs absences induisent un retard. En revanche, l'expression de *Sox9* n'est pas impactée par ces invalidations simples ou combinées de *Nr5a1* et *Nr0b1*, indiquant que les gènes cibles de *Nr5a1* ne sont pas tous impliqués dans les régulations faisant intervenir *Nr5a1* et *Nr0b1*. Ainsi, cette étude montre que même si *Nr0b1* et *Nr5a1* sont considérés comme des antagonistes grâce à des études *in vitro*, *in vivo* durant le développement ils sont aussi capables d'agir indépendamment ou en coopération durant la différenciation des CLF (Park et al., 2005).

- GATA4 et son cofacteur FOG2 sont capables d'influencer de plusieurs manières le développement des CLF. GATA4 et FOG2 sont impliqués dans la régulation de

l'expression de *Sry* dans les CS et dans la différenciation des CS et des CL (Tevosian et al., 2002). Lorsqu'il est invalidé dans des cellules ES (cellules souches embryonnaires) ou dans les précurseurs NR5A1-positifs, GATA4 a un rôle autonome dans la différenciation des CLF. En effet, ces dernières ne sont plus capables de se différencier en CLF et leur nombre diminue drastiquement (Manuylov et al., 2011 ; Bielinska et al., 2007).

- Enfin, NR5A1 est connu pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (Morohashi et al., 1992 ; Morohashi and Omura, 1996). Une fois que les CLF et les CS ont émergé, l'expression de *Nr5a1* diminue dans les CS mais reste importante dans les CLF. L'invalidation d'une copie de *Nr5a1* provoque une accumulation de lipides dans les CL une diminution de l'expression de *Cyp11a1* connue pour être une cible de NR5A1 (Hatano et al., 2016). L'invalidation conditionnelle de *Nr5a1* uniquement dans les CL provoque une diminution des marqueurs de la stéroïdogénèse comme *Cyp11a1*, *Star* (*Steroidogenic acute regulatory protein, mitochondrial*) ce qui induit chez l'adulte un niveau très bas de testostérone. Ils présentent aussi une hypoplasie des testicules et une cryptorchidie (Jeyasuria et al., 2004). Cette invalidation ne semble pas induire la mort des CL mais plutôt un défaut de leur différenciation et de leur fonction (Jeyasuria et al., 2004)(Hatano et al., 2016).

Lors de la différenciation des CL il a été vu que certains signaux extérieurs comme les facteurs de croissances ou d'autres éléments sécrétés par les autres cellules du testicule sont très importants voire essentiels.

- En effet, les CS expriment le gène *Dhh* (Desert hedgehog) alors que les CL et les cellules myoïdes périvitubulaires expriment à leur surface son récepteur PTCH1 codé par le gène *Ptch1*. L'invalidation de *Dhh* chez la souris provoque une féminisation des animaux mâles dans plus de 92 % des cas avec une quasi absence de CLF, une absence de lame basale entre les CS et les cellules myoïdes périvitubulaires ainsi qu'une désorganisation importante des tubes séminifères conduisant à leur stérilité. Le petit nombre de CLF restantes n'expriment pas ou faiblement leurs marqueurs spécifiques à savoir NR5A1 et *Cyp11a1* (*P450 Side Chain Cleavage*) (Bitgood et al., 1996 ; Clark et al., 2000 ; Pierucci-Alves et al., 2001). Ce phénotype ne provient pas d'un défaut de prolifération ou de survie des précurseurs des CL. En effet, la voie impliquant DHH et

PTCH1 permet l'expression indispensable de *Nr5a1* et *Cyp11a1* pour la différenciation des précurseurs en CL (Yao et al., 2002).

- De la même manière, *Pdgfa* (Platelet-derived growth factor- α) est exprimé par les CS alors que son récepteur codé par le gène *Pdgfra* (Pdgf receptor- α) est exprimé par les cellules interstitielles. L'inactivation de *Pdgfa* ou de son récepteur provoque des malformations des cordons séminifères et des défauts ou une absence de différenciation des CLF dans les testicules des animaux mutants (Gnessi et al., 2000 ; Brennan et al., 2003).

- L'inactivation de la voie signalisation Notch par des méthodes pharmacologiques ou d'inactivation génique dans les précurseurs NR5A1-positifs provoque une augmentation du nombre de CLF et une surexpression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (Liu et al., 2016 ; Tang et al., 2008 ; Wen et al., 2016). En parallèle, l'équipe de Blanche Capel montre que l'activation forcée de la voie Notch provoque une diminution du nombre de CLF différenciées qui restent à l'état de précurseurs. De plus, ils mettent en évidence un rétrocontrôle de cette voie par la testostérone (DeFalco et al., 2013). Ainsi, la voie Notch aurait pour rôle de maintenir la balance entre le nombre de précurseurs et de CLF différenciés.

- Certains microARNs exprimés par les cellules situées à l'intérieur des cordons séminifères sont également impliqués dans la synthèse d'androgènes ou dans la régulation de la stéroïdogénèse (Lu et al., 2016 ; Liu et al., 2014 ; Hu et al., 2012). Il a été découvert que les CLF expriment une protéine de liaison des microARNs *Lin28b* (Gaytan et al., 2013). Son rôle est encore inconnu mais ces données, bien qu'indirectes, laissent penser que les microARNs pourraient avoir un rôle dans la régulation de différenciation des CLF.

Les études portant sur le développement embryonnaire des testicules portent majoritairement sur les cellules intra-tubulaires et plus particulièrement sur des CS. De nouveaux travaux montrent le rôle déterminant des cellules interstitielles qui sont aussi déterminantes pour permettre une fertilité optimale à terme. Il reste néanmoins à comprendre comment les CL se différencient et à identifier précisément leurs précurseurs. En effet, si les CLF et les CLA partagent les mêmes précurseurs il reste à comprendre par quel mécanisme ces derniers sont influencés pour choisir leur destinée. De la même manière, s'ils ne partagent pas les mêmes précurseurs, il serait intéressant de savoir

comment les CLF influencent la différenciation des CLA, comme cela a pu être suggéré dernièrement. Les nouvelles technologies de séquençage de l'ARN sur cellule unique ou encore les outils génétiques de traçage cellulaire devraient être déterminants dans les prochaines années pour répondre à ces questions.

C. Les cellules myoïdes pérیتubulaires

Les cellules myoïdes pérیتubulaires (CMP) font partie des cellules interstitielles et sont localisées à la périphérie des cordons séminifères en contact avec la surface basale des CS (Skinner et al., 1985). Avec les CS, les CMP vont produire la matrice extracellulaire qui permettra de créer une frontière entre l'espace interstitiel et les cordons séminifères (Tung et al., 1984 ; Georg et al., 2012). C'est pourquoi les CMP sont importantes pour le développement de l'architecture testiculaire.

Cependant, l'une des difficultés majeures pour l'étude des CMP et leur origine est le manque de marqueurs spécifiques précoces de ce type cellulaire. Malheureusement, les marqueurs spécifiques des CMP sont aussi exprimés par d'autres types de cellules de l'espace interstitiel (Jeanes et al., 2005). Les CMP apparaissent entre 12,50jpc et 13,50jpc (Jeanes et al., 2005 ; Cool et al., 2008). Si l'on considère α -SMA (α -Smooth Muscle) comme un marqueur spécifique, ce dernier est visible à partir de 12,50jpc. En revanche, à partir de 13,50jpc les CMP sont morphologiquement discriminables.

Néanmoins, certaines études permettent de mettre en lumière le rôle direct ou indirect des CS dans le processus de différenciation des CMP. En effet, l'inactivation de *Nr0b1* provoque une diminution du nombre des CMP et des CLF ainsi qu'une désorganisation des cordons séminifères (Meeks et al., 2003b). De la même manière, l'inactivation de *Dhh* provoque des défauts de différenciation des CMP et une absence de lame basale entre les CS et les CMP (Clark et al., 2000 ; Pierucci-Alves et al., 2001 ; Yao et al., 2002). Par contre, l'expression ectopique de *Dhh* dans l'ovaire provoque l'apparition de CLF mais pas de CMP (Barsoum et al., 2009). Ainsi, *Dhh* n'est pas un facteur déterminant pour la différenciation des CMP, mais il est nécessaire à leur maintien. Enfin l'inactivation de *Wtl* dans les CS provoque des défauts de différenciation des CLF, des CMP et de leurs précurseurs (Wen et al., 2016).

Il reste beaucoup de mystère concernant le développement, les fonctions et les interactions des CMP. Le manque de marqueur spécifique des CMP en est sûrement la principale cause.

2.2. Le testicule fœtal : Différenciation des cellules germinales

Chez la souris, les premiers signes de différenciation sexuelle apparaissent à 13,50jpc quand les cellules germinales (CG) de l'ovaire entrent en prophase de première division de la méiose, tandis qu'au même moment les CG du testicule entrent en quiescence. Chez le mâle, la méiose est initiée pendant la période pré-pubère, c'est-à-dire à la fin de la première semaine après la naissance (Teletin et al., 2017). Ces différents mécanismes à la base du destin des CG sont régis par des facteurs provenant de l'environnement gonadique, qui sont déterminants pour le développement d'une fertilité fonctionnelle.

Ainsi, chez le mâle, les CG s'arrêtent progressivement et de manière asynchrone de proliférer entre 12,50jpc et 14,50jpc (Western et al., 2008). Cet arrêt mitotique en phase G1/G0 provoque des changements transcriptionnels importants au niveau des gènes impliqués dans le contrôle et la progression du cycle cellulaire. Par exemple, on constate une augmentation de l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire à savoir, *Cdkn1b* (*p27Kip1*), *Cdkn2b* (*p15INK4b*), *Cdkn2a* (*p16ink4a*), une diminution de l'expression des *cyclinE* (*Ccne1* et *Ccne2*) et une déphosphorylation (activation) de la protéine du rétinoblastome (RB1) (Western et al., 2008)(Spiller et al., 2009). Plusieurs facteurs ont été découverts comme pouvant réguler l'arrêt de la mitose et prévenir une méiose prématurée :

- NANOS2 (Nanos C2HC-Type Zinc Finger 2) est une protéine de liaison à l'ARN exclusivement exprimée dans les CG (Tsuda et al., 2003). L'invalidation de *Nanos2* provoque l'entrée en méiose prématurée des CG puis leur mort par apoptose (Tsuda et al., 2003 ; Barrios et al., 2010). NANOS2 est donc considéré comme un inhibiteur de la méiose. En effet, NANOS2 est impliqué dans la dégradation de certains ARNs indispensables à l'entrée en méiose à savoir *Stra8* et *Sycp3* (Suzuki and Saga, 2008 ; Suzuki et al., 2010). Le rôle de *Nanos2* ne s'arrête pas à la régulation de l'entrée en méiose. En effet, une double invalidation de *Nanos2* et *Stra8* a permis d'étudier le rôle de *Nanos2* en dehors de la méiose. Ces modèles d'invalidation montrent aussi que *Nanos2* est impliqué dans le maintien de la quiescence et la différenciation sexuelle des CG en participant à la régulation des gènes spécifiques des CG mâles comme *Dnmt3l*, *Tdrd1* et *Miwi2/Piwi-like 4*. Ce résultat est cohérent avec le fait que des études précédentes avaient montré que *Nanos2* se fixe aux ARNs de *Gata2* et *Taf7l*, deux gènes aussi impliqués dans la différenciation des CG (Barrios et al., 2010 ; Saba et al., 2014).

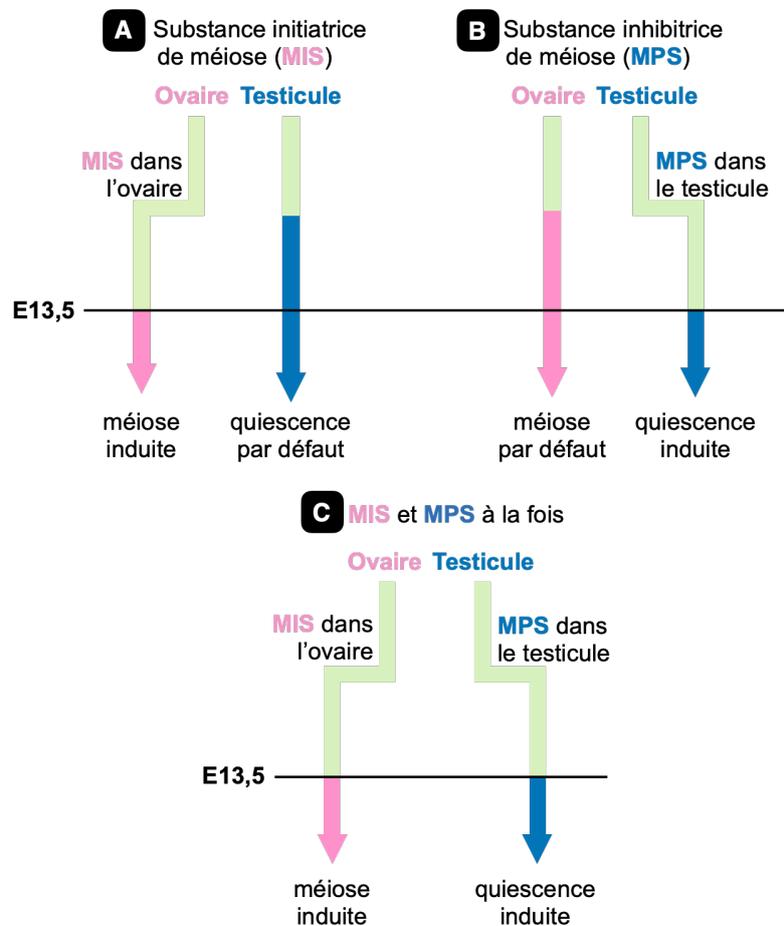


Figure 10 : Modèles proposés pour l'initiation de la méiose.

(A) Modèle dans lequel il existe une « substance initiateuse de méiose » appelée MIS (meiosis inducing substance) responsable de l'initiation de méiose et présente uniquement dans l'ovaire.

(B) Modèle dans lequel il existe une « substance inhibitrice de méiose » appelée MPS (meiosis preventing substance) responsable de l'inhibition de l'initiation de méiose et présente uniquement chez le testicule.

(C) Il existe respectivement une MIS et une MPS dans l'ovaire et le testicule ayant des actions antagonistes.

Adapté de (Kocer et al., 2009)

- Le facteur de croissance FGF9 est exprimé à 12,50jpc dans les cordons des gonades mâles (Colvin et al., 2001 ; Schmahl et al., 2004). Chez les mâles invalidés pour *Fgf9* une grande partie des CG disparaissent et celles qui persistent sont en méiose (Colvin et al., 2001). Toutefois, l'ajout de FGF9 dans des cultures de CGP isolées augmente leur survie sans que les CS ne soient présentes dans la culture (DiNapoli et al., 2006). Pour influencer l'entrée en méiose, FGF9 agirait sur les CG pour les rendre moins sensibles à l'acide rétinoïque, inhiber l'expression de *Stra8* et promouvoir l'expression des gènes spécifiques des CG mâles comme *Nanos2* (Bowles et al., 2010). Pour mieux comprendre les effets de *Fgf9* sur les CG, Ulu et al. ont exposé des CG en culture à différentes doses de FGF9. L'exposition à de faibles doses de FGF9 provoque une augmentation de l'expression des gènes spécifiques des CG mâles *Nanos2* et *Dnmtl3* et une augmentation de la phosphorylation de p38 MAPK. La signalisation p38 MAPK est un facteur promouvant l'arrêt de la prolifération des CG et leur entrée en quiescence mitotique chez le mâle (Ewen et al., 2010). A l'inverse une exposition à de fortes doses de FGF9 induit la suppression de l'expression des gènes spécifiques des CG mâles mais la stimulation de la voie ERK1/2 qui promeut la prolifération des CG. Ainsi ces données montrent que FGF9 régule la différenciation et la prolifération des CG de manière dose-dépendante (Ulu et al., 2017).

- La prostaglandine D2 est produite pas les CS mais aussi par les CG durant le développement embryonnaire. En l'absence de PGD2 l'arrêt mitotique des CG n'a pas lieu et les CS présentent des défauts de différenciation. L'équipe de Brigitte Boizet-Bonhoure a montré que PGD2 est capable de réguler directement *Cdkn1a* à la hausse. *Cdkn1a* est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire grâce à son rôle de régulateur du point de contrôle G1/S (Moniot et al., 2014).

Le dimorphisme sexuel d'entrée en méiose a été le sujet de nombreuses études. En effet, dans un premier temps on a voulu savoir si la destinée des cellules germinales était dépendante de leur patrimoine chromosomique ou de leur environnement. Pour cela des expériences de transplantations et de co-cultures de CG mâles et femelles ont été réalisées et ont révélé que l'entrée en méiose était dépendante de l'environnement somatique des CG (Byskov and Saxén, 1976 ; Evans et al., 1977). Les chercheurs se sont alors mis en quête des facteurs influençant la destinée des CG. Dans ces études il est question de déterminer s'il existe une « substance initiatrice de la méiose » appelée MIS (meiosis inducing substance) qui serait exprimée dans

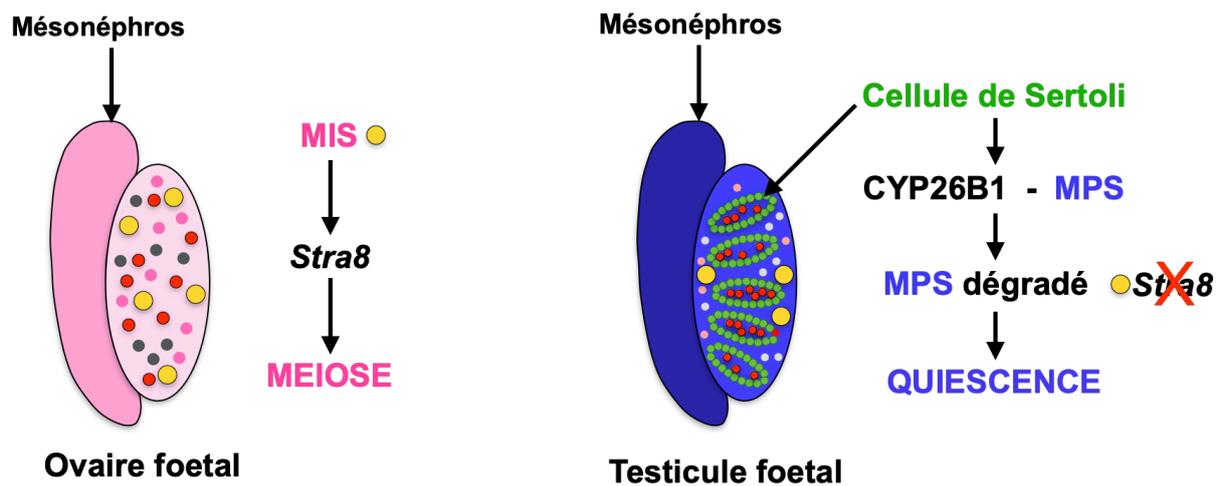


Figure 11 : Modèles proposés pour l'initiation de la méiose par une substance initiatrice de méiose

Chez la femelle, la diffusion d'une « substance initiatrice de méiose » appelée MIS (meiosis inducing substance) dans l'ovaire foetal induit l'expression de *Stra8* par les cellules germinales qui entrent alors en méiose.

Chez le mâle, une « substance inhibitrice de méiose » appelée MPS (meiosis preventing substance) est présente dans le testicule foetal mais les cellules de Sertoli qui entourent les cellules germinales synthétisent CYP26B1. Ce dernier est chargé de métaboliser la MPS. Les cellules germinales sont alors protégées de l'action de la MPS et *Stra8* n'est pas exprimé. Les cellules germinales n'entrent pas en méiose mais en quiescence chez le mâle.

Adapté de (Griswold et al., 2012)

l'ovaire fœtal uniquement, ou une « substance inhibitrice de la méiose » appelée MPS (meiosis preventing substance) présente uniquement dans le testicule fœtal, ou les deux à la fois, dans l'ovaire fœtal et le testicule fœtal, respectivement. (Figure 10)(Kocer et al., 2009).

L'acide tout-trans rétinoïque (ATRA), produit par le mésonéphros, structure adjacente à la gonade, s'est rapidement imposé comme MIS potentielle dans l'ovaire fœtal car il induit l'expression de son gène cible *Stra8*, gène indispensable à l'entrée en méiose (Baltus et al., 2006). Néanmoins, lorsque l'on invalide de manière concomitante deux enzymes responsables de la majeure production de l'ATRA la méiose est capable de s'initier chez la femelle (Kumar et al., 2011). Plus récemment, il a été montré que l'invalidation des trois récepteurs de l'ATRA, les RARs, n'empêche pas l'initiation de la méiose dans l'ovaire fœtal (Vernet et al., 2020). Cette dernière étude constitue un virage important car elle invalide le dogme jusqu'alors admis selon lequel l'ATRA déclenche l'initiation de la méiose (Figure 11)(Bowles and Koopman, 2007).

En parallèle, le candidat pour la MPS est CYP26B1 qui est une enzyme capable de dégrader l'ATRA et qui n'est exprimée que dans les CS des gonades mâles (Koubova et al., 2006 ; Bowles et al., 2006 ; Baltus et al., 2006). L'invalidation de CYP26B1 conduit à l'entrée prématurée en méiose des CG (MacLean et al., 2007). Lors de l'invalidation de *Sox9* son expression est diminuée. A l'inverse *in vitro*, dans un modèle cellulaire, la surexpression de *Sox9* ou *Nr5a1* induit une forte augmentation de l'expression de *Cyp26b1*. De plus, la surexpression simultanée de *Sox9* et *Nr5a1* décuple l'augmentation de l'expression *Cyp26b1* permettant de conclure que *Sox9* et *Nr5a1* agissent de manière additive et non en coopération. Enfin, l'expression de *Foxl2* dans ce modèle où *Sox9* et *Nr5a1* sont surexprimés, provoque une diminution de l'expression de *Cyp26b1*. Aussi, chez les souris XX invalidées pour *Foxl2* on constate une augmentation de l'expression de *Cyp26b1*. Ainsi, chez le mâle *Sox9* et *Nr5a1* régulent positivement l'expression de *Cyp26b1* alors que chez la femelle *Foxl2* participe à son inhibition (Kashimada et al., 2011). Ainsi, il reste encore à découvrir s'il existe un MIS, et si oui lequel. Une première hypothèse avait été proposée par l'équipe de Kumar et al.,. Il est possible que CYP26B1 soit bien la MPS de la gonade mâle mais en dégradant une autre substance que l'ATRA qu'il reste encore à découvrir (Kumar et al., 2011).

La période de quiescence s'achève après la naissance chez le mâle puis l'entrée en méiose est réalisée à la fin de la première semaine de vie. La méiose est un processus de division spécifique des CG consistant à produire des cellules haploïdes à partir de cellules diploïdes. Pour arriver à l'obtention de cellules haploïdes, la CG diploïde devra subir deux divisions méiotiques. La première est appelée « réductionnelle », elle consiste à séparer les chromosomes

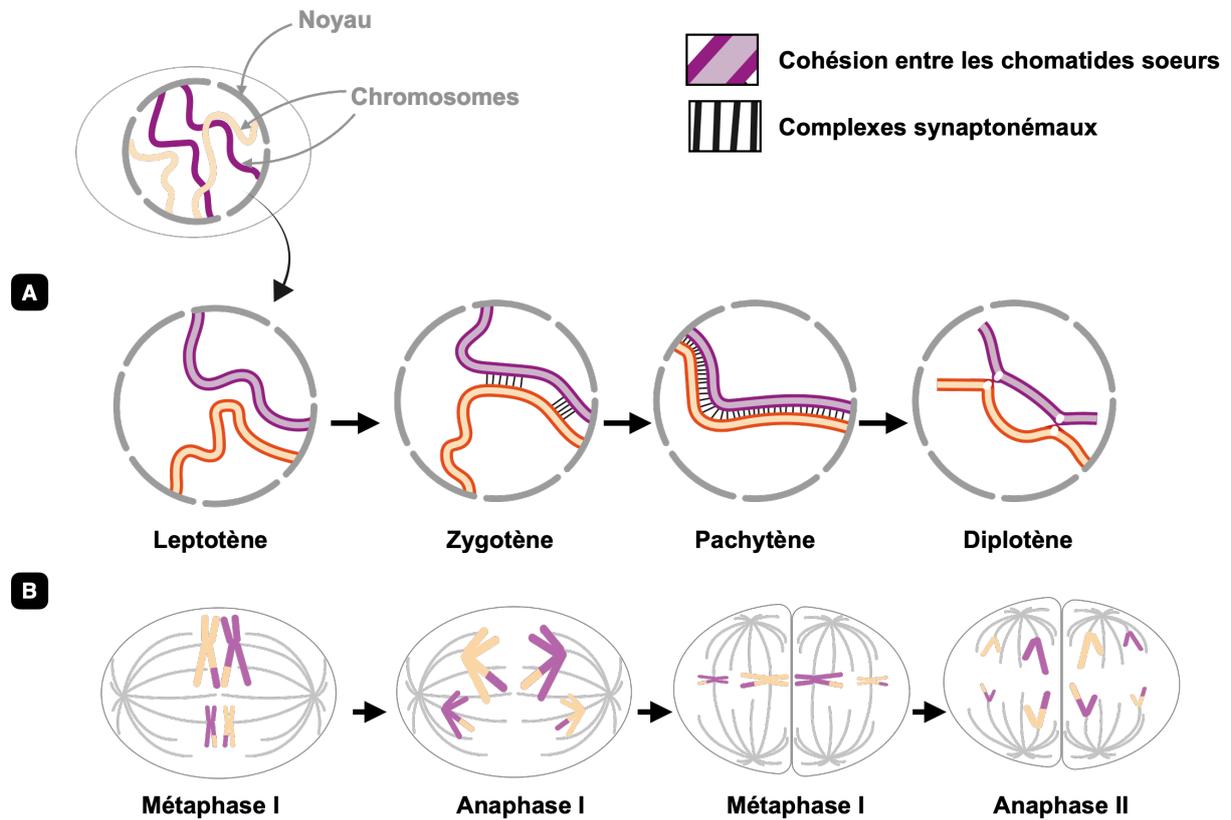


Figure 12 : Étapes chronologiques de la méiose chez le mâle.

(A) La méiose est composée de 4 étapes : la prophase, la métaphase, l’anaphase et la télophase. La prophase qui en est la première étape est subdivisée en 4 stades : leptotène, zygotène, pachytène et diplotène. Durant le stade leptotène les chromosomes commencent à se condenser et subissent des cassures doubles brins. Le stade zygotène est caractérisé par l’appariement progressif des chromosomes homologues grâce au complexe synaptonémaux. Au stade pachytène les chromosomes sont appariés sur toute leur longueur et vont s’échanger des fragments de chromatides par recombinaison homologue. Durant le stade diplotène les chromosomes se séparent mais restent associés par des zones de contacts appelés « chiasma ».

(B) Pour obtenir des cellules haploïdes, la cellule germinale diploïde va subir deux divisions méiotiques. La première est dite « réductionnelle » elle consiste à séparer les chromosomes homologues. Durant la métaphase I les chromosomes se placent sur un plan équatorial puis chaque chromosome d’une paire migre vers un pôle opposé en anaphase I. Puis la seconde division méiotique appelée « équationnelle » vise à séparer les chromatides sœurs. Durant la métaphase II les chromosomes se placent sur un plan équatorial et durant l’anaphase II les chromatides sœurs d’un chromosome migrent vers un pôle opposé. Ces deux divisions méiotiques permettent d’obtenir des spermatozoïdes haploïdes

homologues et seconde est appelée « équationnelle », elle consiste à séparer les chromatides sœurs. Chaque division est constituée de 4 étapes : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

La prophase est subdivisée en 4 étapes appelées leptotène, zygotène, pachytène, et diplotène (Jan et al., 2012)(Figure 12). Au stade leptotène les chromosomes se condensent et commencent à subir des cassures doubles brins puis s'apparient progressivement sur toute leur longueur grâce aux complexes synaptonémaux au stade zygotène. Au stade pachytène les chromosomes homologues appariés vont s'échanger des fragments de chromatides par recombinaison homologue, ces échanges sont appelés « crossing over ». Pour que la méiose se déroule normalement, il faut au moins un « crossing over » par paire de chromosomes homologues. Ce phénomène est garant du brassage génétique important pour l'évolution. Ensuite, au stade diplotène les complexes synaptonémaux vont disparaître et les chromosomes homologues se séparer mais resteront attachés uniquement au niveau de zones de contacts appelés « chiasma ». En métaphase I les chromosomes vont migrer sur un plan équatorial puis chaque chromosome homologue d'une paire va migrer vers un pôle opposé en anaphase I. Enfin durant la télophase les deux pools de chromosomes se décondensent et vont être séparés par une nouvelle membrane nucléaire autour de chaque pool. La seconde division méiotique est très courte et n'est pas précédée d'une duplication de l'ADN. Elle consiste en une simple division cellulaire et vise à séparer les chromatides sœurs pour obtenir des spermatides rondes haploïdes présentant un patrimoine génétique unique qui subiront la spermatogénèse.

2.3.L'ovaire : Régulation génétique du développement ovarien

Chez la femelle, en l'absence du chromosome Y et donc de l'expression de *Sry*, c'est le programme de détermination sexuel féminin qui se déroule. Comme pour le testicule les cellules somatiques de l'ovaire sont issues des précurseurs NR5A1-positifs. Toutefois, la différenciation des cellules somatiques chez la femelle se fait par des changements transcriptionnels moins dynamiques et avec des transformations morphologiques plus discrètes. Ainsi, dans l'ovaire, à partir de 10,50jpc une partie des précurseurs NR5A1-positifs commencent à se différencier pour devenir des cellules de la pré-granulosa. L'autre partie des précurseurs donnera plus tard les cellules stéroïdogènes de l'ovaire appelées les cellules de la thèque. Chez la femelle l'état de bipotentialité des cellules somatiques se termine à 12,50jpc, soit un jour plus tard que chez le mâle. Néanmoins, malgré l'expression des gènes spécifiques de l'ovaire, les gènes traduisant l'état de bipotentialité sont encore exprimés à 16,50jpc (Stévant et al., 2019).

Le programme génétique qui sous-tend la différenciation des cellules somatiques de l'ovaire dépend de l'expression de plusieurs gènes et de l'activation de certaines voies que nous décrirons ci-dessous.

A. La voie Wnt/ β -caténine et ses activateurs *Wnt4* et *Rspo1*

WNT4 (Wingless-Related MMTV Integration Site 4) et RSPO1 (Roof plate specific spondin 1) sont deux protéines présentes dans les crêtes génitales où elles sont impliquées de la prolifération cellulaire. Entre 11,50jpc et 12,50jpc leur expression diminue dans les gonades XY mais elle est augmentée dans les cellules somatiques des gonades XX (Vainio et al., 1999 ; Parma et al., 2006). WNT4 et RSPO1 sont responsables de l'activation de la voie de signalisation β -caténine dès 12,50jpc dans la gonade XX (Chassot et al., 2011). Pour cela, WNT4 se fixe à son récepteur Frizzled et ses co-récepteurs LRP5 et LRP6 (LDL receptor-related protein 5 or 6). Cette interaction induit l'hyper-phosphorylation de DVL (Dishevelled) qui inactive le complexe de séquestration et de dégradation de la β -caténine (aussi appelée *Cttnb1*). Ce complexe de dégradation de la CTNNB1 est composé de la protéine AXIN1 (codée par le gène *Axin1*), de la kinase GSK3b (codée par le gène *Gsk3b*, *glycogen synthase kinase 3 beta*) et de la protéine APC (codée par le gène *Apc*, *WNT signaling pathway regulator*). Une fois le complexe de dégradation inactivé, CTNNB1 est transloquée dans le noyau où elle

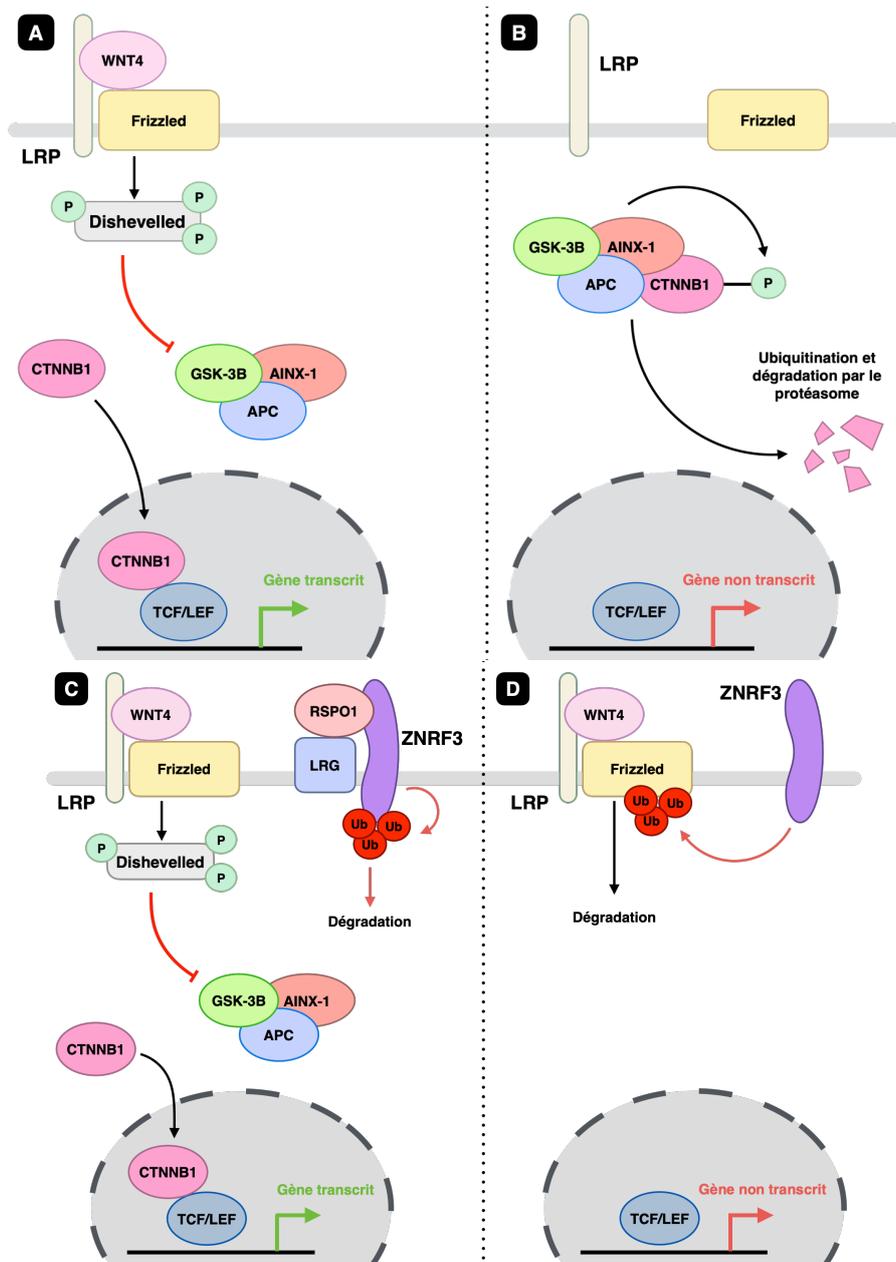


Figure 13 : Schéma de l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine par WNT4 et RSPO1

(A) Quand WNT4 est présent il se fixe à son récepteur Frizzled. Cette fixation provoque la phosphorylation de DVL qui pourra libérer la CTNNB1 de son état de séquestration et éviter sa dégradation. CTNNB1 pourra alors activer la transcription de ces gènes cibles.

(B) En l'absence de WNT4, le complexe de dégradation composé de l'AXIN1, GSK3b et APC va phosphoryler la CTNNB1 pour induire sa dégradation par le protéasome.

(C) La présence de RSPO1 sur son récepteur LGR inactive ZNRF3 qui va s'auto-ubiquitiner et être dégradé.

(D) En l'absence de RSPO1, ZNRF3 est libre pour ubiquitiner Frizzled le récepteur de WNT4 pour induire sa dégradation. En l'absence de récepteurs disponibles WNT4 sera alors incapable d'activer la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

Adapté de (MacDonald et al., 2009)

s'associe à des facteurs de transcription pour activer l'expression de gènes cibles. En l'absence de WNT4, CTNNB1 est phosphorylée par GSK3b puis est ubiquitinylée et sa dégradée par le protéasome (Hernandez Gifford, 2015)(Figure 13). RSPO1 intervient plus tôt dans ces cascades de signalisation. En effet, RSPO1 va inactiver la dégradation du récepteur Frizzled par l'ubiquitine ligase ZNRF3 (Zinc and Ring Finger 3 aussi appelée RNF43). Pour cela, RSPO1 se fixe à son récepteur LGR4 ou LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4 or 5) ce qui provoque la liaison de ZNRF3 à ce complexe récepteur/ligand et permet son auto-ubiquitination et enfin dégradation. Ainsi, les récepteurs de WNT4 sont disponibles en plus grand nombre ce qui permet d'amplifier l'activation de la voie Wnt/ β - caténine (Figure 13) (Hao et al., 2012).

L'inactivation de *Wnt4* ou *Rspo1* chez la souris XX provoque une inversion sexuelle partielle à la naissance avec l'expression de *Sox9*, l'apparition de cordons séminifères, la persistance des dérivés des canaux de Wolff (épididymes, vésicules séminales, canaux déférents...) mais aussi des dérivés des canaux de Müller (oviducte, utérus, vagin), une vascularisation masculinisée de la gonade et la production d'androgènes (Vainio et al., 1999 ; Jeays-Ward et al., 2003 ; Yao et al., 2004 ; Chassot et al., 2008 ; Tomizuka et al., 2008).

Des études ont permis de confirmer les dynamiques de régulation entre *Wnt4* *Rspo1* et *Cttnb1*. Après l'inactivation de *Rspo1*, les niveaux d'expression de *Wnt4* et *Cttnb1* sont diminués alors qu'après l'inactivation de *Wnt4*, les niveaux d'expression de *Rspo1* restent normaux. RSPO1 agit bien en amont et indépendamment de *Wnt4* et *Cttnb1*. Cependant, l'inactivation de *Rspo1* et *Wnt4* provoquent une forte diminution de l'expression de *Cttnb1* mais pas son abolition totale. Ainsi, la régulation de l'expression de *Cttnb1* est en partie dépendante d'autres régulateurs positifs de la voie Wnt/ β -caténine qui restent à découvrir (Chassot et al., 2012).

Ces invalidations respectives provoquent une diminution du nombre de CG ayant des causes différentes. Lors de l'inactivation de *Rspo1*, les CG présentent un défaut de prolifération et d'entrée en méiose caractérisée par une diminution de l'expression de *Stra8*. A l'inverse, lors de l'inactivation de *Wnt4*, la prolifération de CG est intacte mais on constate une augmentation de l'apoptose (Yao et al., 2004 ; Chassot et al., 2011). Ces différences phénotypiques traduisent le fait que *Wnt4* et *Rspo1* ont des fonctions différentes dans le maintien de ces dernières. En effet, *Wnt4* joue un rôle dans la survie des CG, alors que *Rspo1* est impliqué dans la prolifération et la différenciation des CG (Vainio et al., 1999 ; Chassot et al., 2011).

De plus, il peut paraître surprenant que ces invalidations ne provoquent qu'une inversion partielle du sexe. Ainsi, Blanche Capel et son équipe montrent que les cellules de pré-granulosa

mutantes sortent de leur état de quiescence pour subir une différenciation précoce en cellules de granulosa exprimant *Amh*. La sortie de l'état de quiescence est provoquée par la perte des CG méiotiques, qui est un prérequis indispensable à une différenciation précoce. Enfin, les cellules différenciées en granulosa sont capables d'exprimer des gènes sertoliens comme *Sox9*. Ces données permettent de conclure que les cellules de pré-granulosa en quiescence sont incapables d'exprimer des gènes mâles, même en l'absence de *Wnt4* et *Rspo1*, et qu'il existe un lien fort entre les CG méiotiques et les pré-granulosa pour réguler leur état mitotique (Maatouk et al., 2013). Grâce à ce phénomène, on pourrait conclure que la perte des CG provoque l'inversion sexuelle chez la femelle. Néanmoins, des études ont montré par des traitements pharmacologiques que la perte ciblée des CG à l'âge adulte ou à 10,50jpc, au moment de leur arrivée dans les crêtes génitales, n'est pas suffisante pour induire une inversion du sexe chez la femelle (Uhlenhaut et al., 2009 ; Maatouk et al., 2012). Visiblement l'influence de la disparition des CG sur le développement des cellules somatiques de l'ovaire dépend de leur état méiotique.

L'inversion sexuelle subie par les souris femelles invalidées pour *Rspo1* semble causée par l'activation de l'expression de *Sox9*, concomitante avec l'apparition de cordon séminifère à la naissance. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de *Sox9* est suffisante pour induire un développement testiculaire chez des souris XX et XY même en l'absence de *Sry* (Bishop et al., 200 ; Chaboissier et al., 2004a ; Qin and Bishop, 2005 ; Barrionuevo et al., 2006 ; Lavery et al., 2011). Pour mettre en évidence le rôle de *Sox9* dans ce phénotype de réversion du sexe, l'équipe de Marie-Christine Chaboissier a invalidé dans le même temps *Rspo1* et *Sox9* (Lavery et al., 2012). Contre toutes attentes, cette double invalidation ne permet pas d'éviter l'inversion du sexe chez les animaux XX. Les auteurs observent une augmentation de l'expression de *Sox8* et *Sox10*, dont on sait qu'ils sont capables d'induire l'expression d'*Amh*. De plus, *Sox10* est aussi capable d'induire une inversion du sexe quand il est exprimé de manière ectopique chez des animaux XX (Polanco et al., 2009). Pour valider cette redondance fonctionnelle, l'équipe de Marie-Christine Chaboissier a généré un modèle invalidé pour *Rspo1*, *Sox9* et *Sox8* simultanément. Les animaux XX ont alors développé des ovaires atrophiés (Richardson et al., 2020). Par contre, chez des animaux XY doublement invalidés pour *Sox9* et *Rspo1* on constate une restauration du phénotype de féminisation. Ainsi, on peut conclure que *Rspo1* est indispensable à la réversion du sexe chez des animaux XY mais, qu'à l'inverse, *Sox9* est facultatif à la masculinisation des animaux XX à cause de sa redondance fonctionnelle avec d'autres membres de la famille des Sox. D'ailleurs cette étude apporte une nouvelle preuve que *Sox8* est capable de compenser *Sox9* de manière autonome. Enfin, il a longtemps été pensé que

la différenciation ovarienne était la voie empruntée par défaut en l'absence de *Sry* ou *Sox9*. Cette étude permet de prouver que la voie de différenciation ovarienne nécessite aussi d'être activée et que sa régulation est aussi dépendante de l'expression de gènes essentiels, même en l'absence de *Sry* ou *Sox9* (Lavery et al., 2012). Enfin, des études du même type ont été réalisées en invalidant simultanément *Sox9* et *Ctnnb1* ou *Wnt4*. Des résultats similaires ont été observés et la conclusion des auteurs est la même. *Sox9* est facultatif pour l'inversion du sexe chez les souris XX et *Ctnnb1* serait un gène essentiel au développement ovarien (Nicol and Yao, 2015 ; Tang et al., 2020).

B. *β*-caténine, effecteur de la voie Wnt/*β*-caténine

CTNNB1 aussi appelé *β*-caténine est l'effecteur de la voie Wnt/*β*-caténine activée par RSPO1 et WNT4. Quand elle est dans le noyau, elle agit en s'associant aux facteurs de transcription LEF/TCF (Lymphoid Enhancer Factor/T-cell Factor) pour induire l'expression de gènes cibles. L'inactivation de *Ctnnb1* récapitule parfaitement le phénotype des animaux invalidés pour *Wnt4*. Par ailleurs, la stabilisation de *Ctnnb1* dans des ovaires en cultures invalidés pour *Wnt4* est capable d'empêcher la masculinisation des ovaires. Enfin, la stabilisation de *Ctnnb1* dans des testicules induit une réversion du sexe (Maatouk et al., 2008). Ensemble ces données placent *Ctnnb1* comme le facteur essentiel et suffisant à la différenciation sexuelle féminine.

Dans ce cadre, il a été montré que l'un des gènes cibles de *Ctnnb1* est *Fst* (Follistatin), dont l'expression est diminuée chez les mutants invalidés pour *Rspo1*, *Wnt4* et *Ctnnb1* (Yao et al., 2004 ; Liu et al., 2010). *Fst* est impliquée dans la survie des CG et est responsable de l'inhibition de la vascularisation masculine. Premièrement, FST est capable de fixer l'Activine B responsable de la formation du vaisseau cœlomique, c'est-à-dire la vascularisation de type masculine. La liaison entre FST et Activine B inactive Activine B qui n'est plus capable de se lier à ses récepteurs. Deuxièmement, chez les souris invalidées pour *Fst*, les CG présentent un phénotype apoptotique similaire aux CG des souris invalidées pour *Wnt4* ou *Ctnnb1* (Yao et al., 2004 ; Liu et al., 2010). Chez ces mutants, on observe une augmentation de l'expression d'un gène codant pour une sous-unité de l'Activine B à savoir l'*Inhbb* (Inhibin, beta B). Les auteurs ont donc proposé que la perte des CG était due à l'augmentation de la présence de l'Activine B, dont les CG expriment les récepteurs. Pour confirmer cette hypothèse, ils montrent alors que la perte de l'*Inhbb* chez ces mutants restaure le phénotype germinale normal.

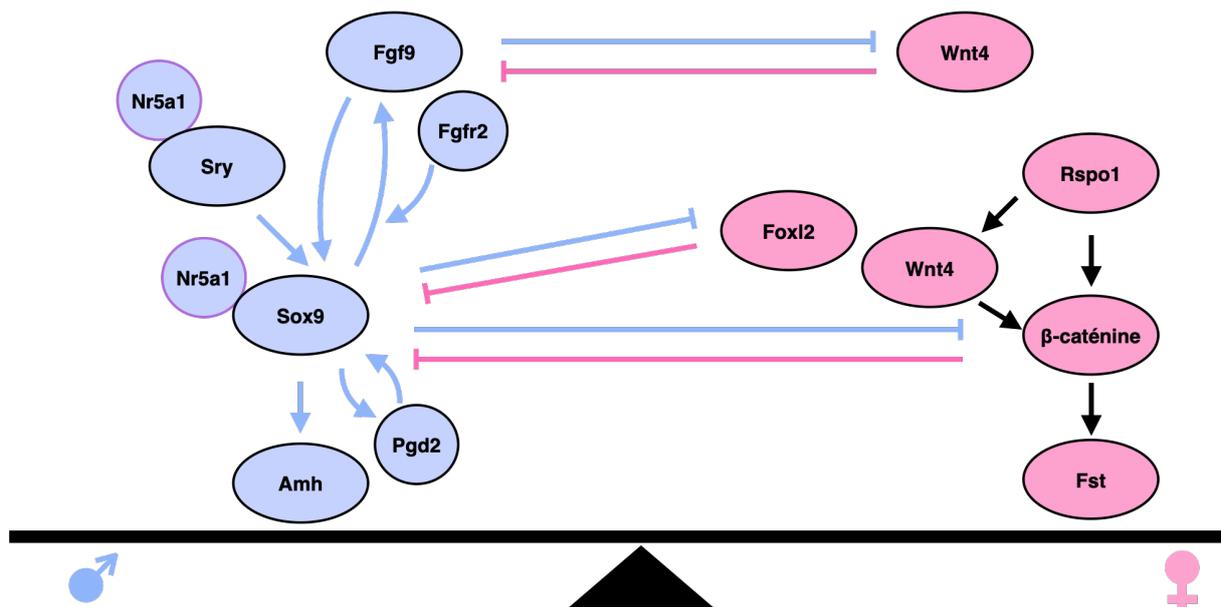


Figure 14 : Les voies de signalisation antagonistes mâle et femelle

La différenciation sexuelle dépend de l'expression des gènes qui promeuvent la différenciation ovarienne ou testiculaire. Par contre, le maintien de l'identité sexuelle dépend de l'antagonisme mutuel qui existe entre les gènes pro-testiculaire et pro-ovarien.

Adapté de (She and Yang, 2017)

Toutefois, chez les mutants *Fst* on ne constate pas de différence d'expression de l'*Inhbb*. Ainsi ces études permettent de conclure que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine agit de deux manières différentes : (i) elle permet l'expression de *Fst*, qui antagonise l'activité de l'Activine B pour empêcher son action au niveau protéique ; (ii) elle permet aussi à un niveau transcriptionnel d'inhiber l'expression d'une sous-unité composant l'Activine B (Yao et al., 2004 ; Maatouk et al., 2008 ; Liu et al., 2010).

Parallèlement il a été montré que CTNNB1 est capable d'inhiber l'expression de plusieurs gènes déterminants pour le développement testiculaire. En effet, CTNNB1 perturbe la liaison entre NR5A1 et la région TESCO de *Sox9*, empêchant ainsi l'activation de la transcription de *Sox9* (Bernard et al., 2012). D'autres études ont aussi montré que CTNNB1 est responsable de l'inhibition de *Sox9*, *Ptgds* et *Amh* et est un antagoniste de *Fgf9* (Kim et al., 2006 ; Chassot et al., 2008 ; Maatouk et al., 2008 ; Bernard et al., 2012). Ainsi, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est indispensable à la différenciation sexuelle féminine d'une part et prévient la détermination masculine d'autre part (**Figure 14**).

C. *Foxl2* (*Forkhead box-L2*)

Foxl2 (Forkhead box-L2) est exprimé à partir de 12,50jpc dans les cellules de la granulosa et de la thèque (Auguste et al., 2012). Les candidats régulant son expression sont nombreux. En effet, l'expression de *Foxl2* est impactée lors de l'inactivation de plusieurs gènes comme *Gata4*, *Fog2*, *Cttnb1* (Manuylov et al., 2008). Néanmoins, il n'a pas été possible de déterminer si ces régulations se font de manière directe ou indirecte par un défaut de différenciation des pré-granulosa, ou via l'absence d'un régulateur intermédiaire. Le rôle exact de *Foxl2* a été difficile à définir tant les phénotypes provoqués par son inactivation sont différents. Les inactivations simultanées de *Foxl2* et *Rspo1* ou *Wnt4* provoquent une aggravation du phénotype des mutants *Rspo1* faisant penser à une synergie d'action entre ces deux protéines (Ottolenghi et al., 2007 ; Auguste et al., 2012). L'inactivation de *Foxl2* ne provoque pas de phénotype embryonnaire précoce chez les souris XX mais plutôt une insuffisance ovarienne (Uda et al., 2004 ; Schmidt et al., 2004). Par contre chez la chèvre XX, l'inactivation de *Foxl2* induit une inversion du sexe au stade embryonnaire (Pailhoux et al., 2002 ; Boulanger et al., 2014). Aussi, l'inactivation de *Foxl2* à l'âge adulte chez la souris provoque une inversion sexuelle rapide des gonades. Les cellules de la granulosa se différencient alors en CS exprimant *Sox9* et *Dmrt1*. Les cellules de la thèque sont aussi impactées et ressemblent alors davantage à des CL produisant des

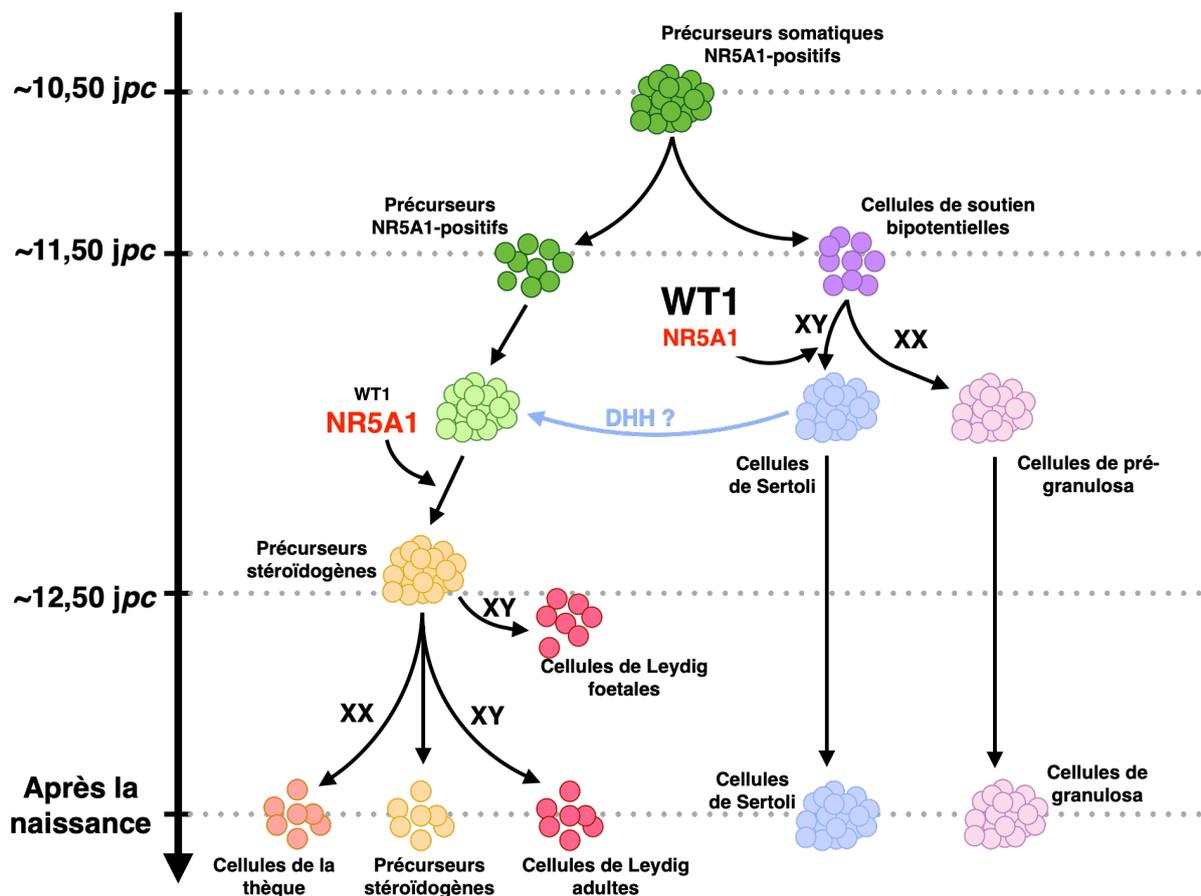


Figure 15 : Dynamique d'apparition et de différenciation des cellules somatiques à partir des mêmes précurseurs cellulaires lors de la détermination du sexe

Les données de séquençage de l'ARN unicellulaire ont identifié une population unique de cellules précurseurs NR5A1-positifs à 10jpc, à l'origine des lignées de soutien et stéroïdogènes dans les gonades XX et XY. Les précurseurs NR5A1-positifs apparaissent à partir de 10,50jpc et donnent naissance aux cellules de soutien et stéroïdogènes indépendamment du sexe de l'individu. Une partie des précurseurs exprimant faiblement *Nr5a1* va devenir des pré-Sertoli puis des cellules de Sertoli à partir de 11,50jpc chez le mâle alors que chez la femelle les précurseurs vont devenir des cellules de la granulosa mais plus tardivement. L'autre partie des précurseurs restera dans cet état indifférencié jusqu'à 12,50jpc pour acquérir un destin stéroïdogène. L'hypothèse proposée est que DHH fait partie des signaux permettant aux précurseurs d'entreprendre leur différenciation en cellules stéroïdogènes. Une fois le signal émis les précurseurs cessent d'exprimer *Wtl* et expriment *Nr5a1* fortement.

Adapté de (Stévant and Nef, 2019)

androgènes à des niveaux comparables à des animaux contrôles XY (Uhlenhaut et al., 2009). Enfin, dans l'ovaire, la surexpression de *Foxl2* dans les cellules somatiques durant la vie fœtale provoque des défauts de différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque (Nicol et al., 2020).

En résumé, *Foxl2* agirait de manière dose dépendante et assurerait le maintien de l'identité féminine tout au long de la vie notamment en antagonisant *Dmrt1*.

2.4.L'origine commune des cellules somatiques du testicule et de l'ovaire

Très longtemps la communauté scientifique a cherché les précurseurs cellulaires de ces lignées, le but étant de savoir si chaque population provenait de précurseurs différents et à quel moment se faisait le dimorphisme sexuel entre cellules de soutien et cellules stéroïdogènes. Dans un premier temps, l'hypothèse privilégiée était que les cellules émergeraient de populations de précurseurs différentes (DeFalco et al., 2011 ; Karl and Capel, 1998). Des équipes supposaient notamment que les cellules de Leydig (CL) partageaient les mêmes précurseurs que les cellules stéroïdogènes des glandes surrénaliennes ou alors que les CL dérivait des cellules de la crête neurale (Middendorff et al., 1993 ; Mayerhofer et al., 1996 ; Hatano et al., 1996). En 2015 une équipe a montré que les CS peuvent se différencier en LC et inversement en modulant l'expression de *Wtl* (Zhang et al., 2015). Cette étude a constitué la première preuve solide que les CS et les CL proviennent d'une même population de précurseurs WT1-positifs présente à 10,50jpc dans les crêtes génitales. Plus récemment, l'équipe de Serge Nef a réalisé des analyses de séquençage de l'ARN sur cellule unique (Single-cell RNA-seq). Ces travaux ont consisté à analyser les signatures transcriptomiques des cellules issues de gonades à différents stades de leur développement. Ils ont alors constaté que les cellules de soutien et les cellules stéroïdogènes émergent à partir d'une population de précurseurs NR5A1-positifs, homogène et multipotente, sans dimorphisme sexuel, mais avec des cinétiques d'apparition différentes (Stévant et al., 2018)(Figure 15). Chez le mâle et la femelle, les cellules de soutien sont les premières à émerger des précurseurs NR5A1-positifs. Ces précurseurs possèdent dans un premier temps un programme initial de soutien indépendant du sexe. Chez le mâle à partir de 11,50jpc une partie des précurseurs va subir des transformations rapides et dynamiques pour devenir des pré-CS puis des CS. Pendant ce temps, une autre partie des précurseurs commencent progressivement à s'engager vers leur destin de cellules stéroïdogènes. Cet engagement débute avant l'achèvement de la différenciation sexuelle.

L'interrogation des auteurs est alors de savoir pourquoi ces précurseurs des cellules stéroïdogènes ne deviennent pas des CS et d'identifier ce qui les protège de ce destin. L'équipe de Serge Nef a découvert que, une fois les CS engagées dans leur différenciation à 11,50jpc, les précurseurs restants perdent l'expression de *Wtl* et *Cbx2*, et ainsi leur capacité à devenir des CS. En effet, ces gènes sont indispensables à l'expression de *Sry*, et *Wtl* est un facteur essentiel de la différenciation et du maintien des CS (Kato-Fukui et al., 2005 ; Kato-Fukui et al., 2012 ; Zhang et al., 2015). En même temps que la perte d'expression de *Wtl* et *Cbx2*, les précurseurs stéroïdogènes expriment progressivement les gènes spécifiques des cellules de Leydig fœtales (Stévant et al., 2018). Cette étude permet de mettre en perspective les résultats des études passées sur le sujet. En effet, comme décrit précédemment (voir Chapitre I.2.1.A.f. *Dhh* (*Desert hedgehog*)), *Dhh* est exprimé à partir de 11,50jpc par les pré-CS. L'inactivation de *Dhh* provoque une diminution du nombre de CLF et son expression ectopique dans des ovaires induit l'apparition de CLF fonctionnelles (Yao et al., 2002 ; Barsoum et al., 2009). Pour pouvoir s'engager vers leur destin et arrêter d'exprimer *Wtl* et *Cbx2* les précurseurs stéroïdogènes doivent sûrement recevoir un signal indiquant que les pré-CS ont commencé leur différenciation. On peut imaginer que *Dhh* fasse partie de ces facteurs signalant aux précurseurs stéroïdogènes qu'ils peuvent débiter leur différenciation et déclencher le programme qui les protègent d'un destin Sertolien. Par contre, le récepteur de *Dhh* qui est PTCH1 n'est détecté qu'à partir de 12,50jpc à la surface des LC (Yao et al., 2002). Il serait intéressant d'étudier son expression dans les précurseurs pour savoir si l'expression de *Dhh* peut avoir une influence sur ces derniers. Par ailleurs, l'expression de *Nr5a1* semble déterminer la différenciation des précurseurs en cellule de soutien ou en cellules stéroïdogènes. En effet, les invalidations de *Pod1* ou *Wtl* qui sont des régulateurs de l'expression de *Nr5a1* induisent l'augmentation de son expression et l'apparition de cellules stéroïdogènes (Cui et al., 2004 ; Chen et al., 2017). Ainsi, une augmentation de l'expression de *Nr5a1* par les précurseurs les mène vers un destin stéroïdogène alors qu'une expression plus faible induit une différenciation en cellule de soutien. En résumé, dans un premier temps, grâce entre autres à *Wtl* et *Pod1*, les précurseurs expriment faiblement *Nr5a1* pour se différencier en cellules de soutien. Dans un second temps, les précurseurs restants doivent recevoir un signal, possiblement DHH, pour commencer leur différenciation en cellules stéroïdogènes et arrêter d'exprimer *Wtl* pour permettre une expression élevée de *Nr5a1* (Figure 15).

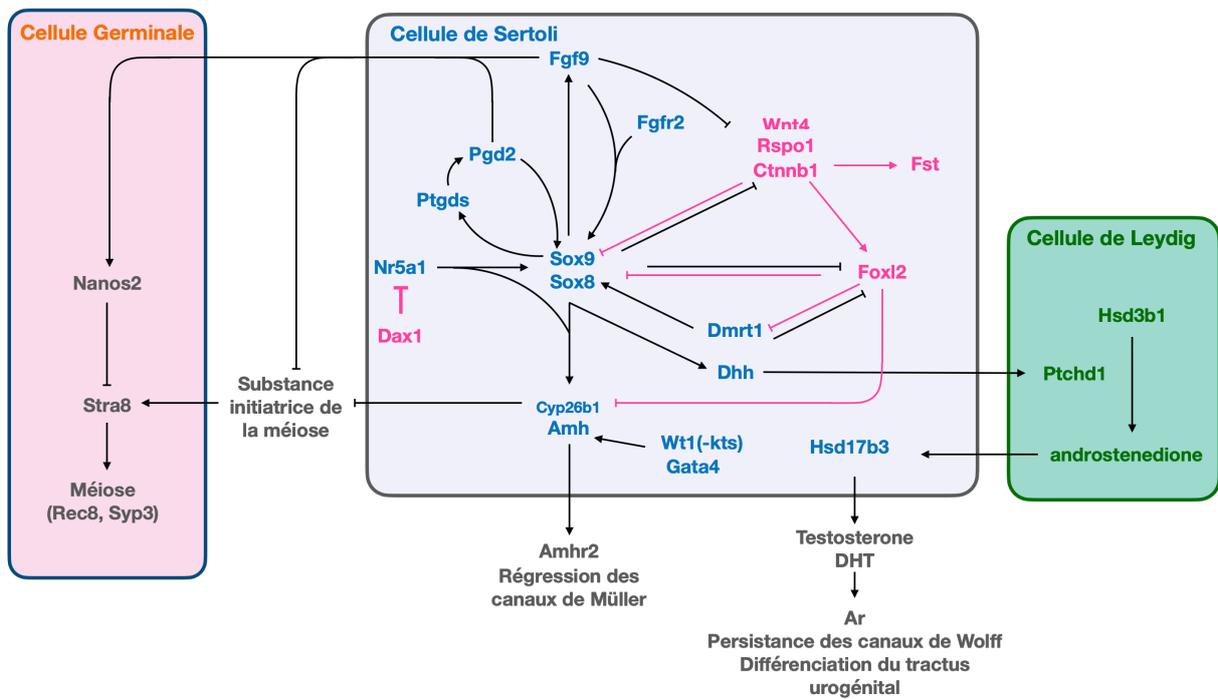


Figure 16 : Modèle du réseau génétique antagoniste entre les gènes régulant la différenciation testiculaire et ovarienne

En rose les gènes impliqués dans le développement ovarien et en bleu ceux impliqués dans le développement testiculaire.

2.5. Maintien de l'identité sexuelle

En plus de leurs rôles lors de la différenciation sexuelle et du développement des gonades, des gènes sont aussi impliqués dans le maintien de l'identité sexuelle. En effet, la relation d'antagonisme mutuel qu'ont certains gènes sexuellement dimorphiques permet de maintenir l'identité sexuelle des ovaires et des testicules.

Ainsi, les études portant sur des modèles murins invalidés présentées précédemment (voir Chapitre I.2.1. Le testicule fœtal : Différenciation des cellules somatiques et 2.3. L'ovaire : Régulation génétique du développement ovarien) ont permis de déterminer un certain nombre d'interaction et d'antagonisme (**Figure 16**).

D'abord *Sox9*, qui est l'acteur central de la voie de différenciation masculine, est capable d'inhiber l'expression de *Foxl2*. En effet, la réduction de 80% de l'expression de *Sox9* induit l'expression de *Foxl2* chez les souris XY, de la même manière que l'invalidation simultanée de *Sox9* et *Sox8* (Chaboissier et al., 2004b ; Barrionuevo et al., 2016 ; Gonen et al., 2017). A l'inverse, l'invalidation de *Foxl2* durant la folliculogénèse induit l'expression de *Sox9*. De plus, il a été vu que FOXL2 est capable d'agir *in vitro* en synergie avec ERS1 (Estrogen Receptor 1) pour inhiber l'expression de *Sox9* (Uhlenhaut et al., 2009). D'autres études ont montré que l'expression de *Cyp26b1* est dépendante de *Sox9* et *Nr5a1* chez le mâle, alors que son inhibition dépend de *Foxl2* chez la femelle (Park et al., 2010 ; Kashimada et al., 2011). Ces études ont permis de déterminer une première relation d'antagonisme entre SOX9 et FOXL2.

L'invalidation de *Dmrt1*, durant le développement fœtal comme celle de *Foxl2*, ne provoque pas de phénotype pathologique chez l'embryon mais, à l'âge adulte, elle induit une réversion du sexe. En effet, l'invalidation de *Dmrt1* provoque une diminution de l'expression de *Sox9*, *Sox8* et induit l'expression de *Foxl2*, *Esr1* (Estrogen Receptor 1), *Esr2* (Estrogen Receptor 2), *Wnt4* et *Rspo1* (Matson et al., 2011). A l'inverse, l'invalidation de *Foxl2* chez les souris XX induit l'augmentation de l'expression de *Dmrt1* (Uhlenhaut et al., 2009). De plus, il a été montré que DMRT1 est capable de se fixer sur des séquences proches des gènes *Foxl2*, *Ers1*, *Ers2* et *Wnt4* pour inhiber leur expression (Matson et al., 2011). Comme l'invalidation de *Dmrt1* et *Foxl2* ne produisent une réversion du sexe qu'après la détermination sexuelle, ils sont considérés comme étant des acteurs indispensables au maintien de cette dernière grâce à leurs actions d'antagonistes mutuels.

Rspo1, *Wnt4* et *Cttnb1* sont aussi capables d'inhiber la différenciation masculine. L'activation de *Cttnb1* chez les souris XY inhibe l'expression de *Sox9* (Maatouk et al., 2008), alors que l'inactivation de *Wnt4* ou de *Cttnb1* chez la femelle induit l'expression de *Sox9*

(Vainio et al., 1999 ; Jeays-Ward et al., 2003 ; Yao et al., 2004)(Chassot et al., 2008 ; Tomizuka et al., 2008). Lors de l'invalidation de *Rspo1* qui est en amont de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, on constate une augmentation de l'expression de *Sox9*, *Amh* et *Ptgds* (Chassot et al., 2008). Enfin, l'invalidation simultanée de *Sox9* et *Rspo1* permet de corriger le phénotype de réversion sexuelle chez le mâle (Lavery et al., 2012 ; Richardson et al., 2020). Par contre, à cause de la redondance fonctionnelle entre les gènes Sox, pour obtenir une correction semblable chez la femelle il faut invalider *Rspo1*, *Sox9* et *Sox8* simultanément (Richardson et al., 2020). Grâce à ces études, il a été possible de montrer les relations d'antagonismes entre, d'une part *Sox9*, *Sox8* et *Rspo1* et d'autre part *Wnt4*, *Ctnnb1* et *Sox9*.

Une surexpression de *Nr0b1* chez la femelle empêche l'activation de l'expression de *Sox9* via NR5A1 (Ludbrook et al., 2012). NR0B1 est aussi capable d'interagir avec NR5A1 pour empêcher l'expression d'*Amh* dans le contexte du syndrome de Denys-Drash (Nachtigal et al., 1998). Pour finir, *Fgf9* et *Wnt4* partagent aussi une relation d'antagoniste. Des ovaires en culture dans lesquels on surexprime *Fgf9* voient leur expression de *Wnt4* diminuer (Kim et al., 2006). L'inversion du sexe qui a lieu chez les animaux XY invalidés pour *Fgf9* ou *Fgfr2* est corrigée par l'inactivation simultanée de *Wnt4* (Jameson et al., 2012). Par contre, l'inversion du sexe chez des souris invalidées pour *Wnt4* n'est pas corrigée par l'invalidation supplémentaire de *Fgf9* (Jameson et al., 2012). *Fgf9* et *Wnt4* ont donc une relation d'antagonisme asymétrique.

Chapitre II

Le développement du tractus urogénital mâle et femelle

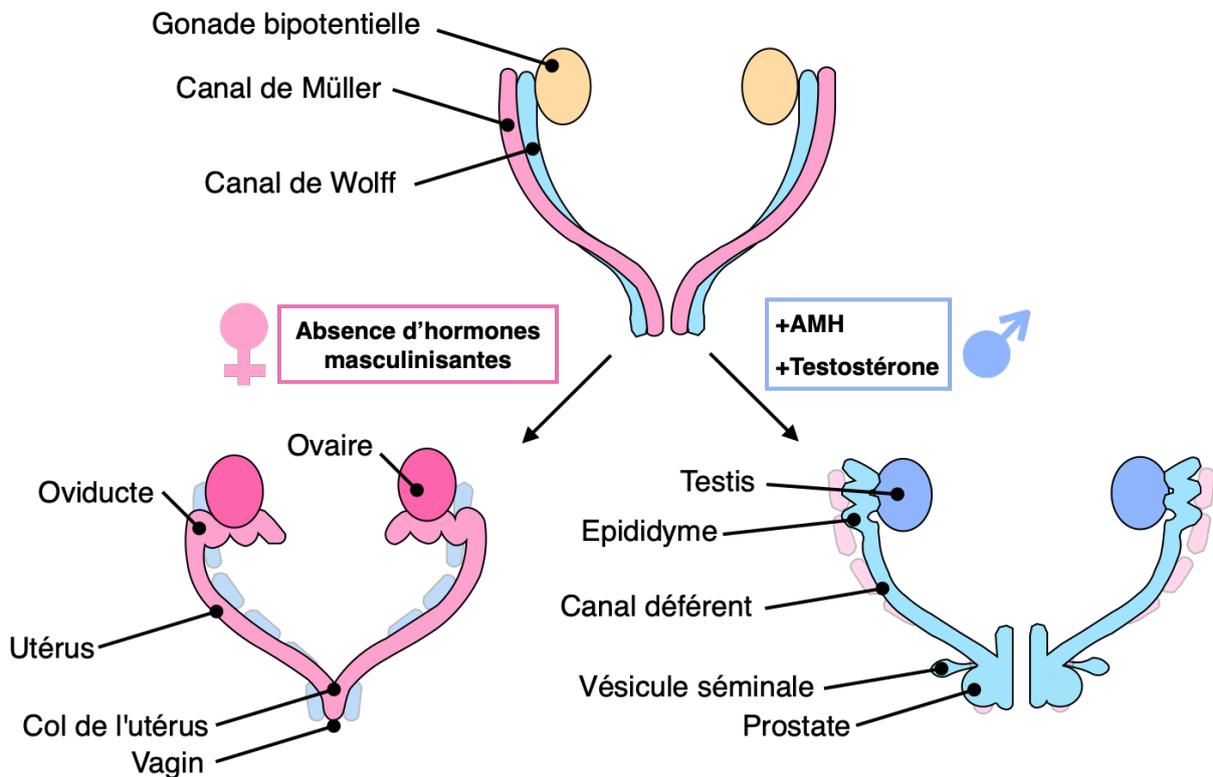


Figure 17 : Différenciation du tractus urogénital mâle et femelle

Avant la différenciation sexuelle le tractus urogénital est bipotentiel. On y retrouve les canaux de Müller aussi appelés canaux paramésonephriques et les canaux de Wolff aussi appelés canaux mésonephriques et les gonades bipotentiels. Après la différenciation sexuelle, chez la femelle les canaux de Wolff vont régresser et les canaux de Müller se différencier en utérus, oviducte et une portion du vagin. Chez le mâle, les canaux de Müller régressent et les canaux de Wolff deviennent l'épididyme, les vésicules séminales et les canaux déférents. La régression des canaux de Müller et la différenciation des canaux de Wolff nécessitent respectivement la présence de AMH et de testostérone. Chez la femelle, la régression des canaux de Wolff et la différenciation des canaux de Müller sont des événements induit par le défaut de présence des hormones masculinisantes.

Adapté de (Kobayashi and Behringer, 2003)

Chapitre II : Le développement du tractus urogénital mâle et femelle

1. L'anatomie du tractus urogénital mâle et femelle

Avant la différenciation sexuelle, les animaux des deux sexes possèdent un tractus urogénital bipotentiel. On y retrouve les canaux de Müller (aussi appelés canaux paramésonephriques), et les canaux de Wolff (aussi appelés canaux mésonephriques). Ils sont issus de la formation des reins primitifs. Après la différenciation sexuelle, ces canaux vont subir un destin différent en fonction du sexe. Chez la femelle, les canaux de Wolff vont régresser et les canaux de Müller vont se différencier en utérus, oviducte et une portion du vagin. Chez le mâle, les canaux de Müller vont disparaître et les canaux de Wolff devenir l'épididyme, les vésicules séminales et les canaux déférents (Georgas et al., 2015)(Figure 17). La régression des canaux de Müller est un évènement dynamique impliquant de nombreux acteurs. En effet, l'expression de *Sry* permet la différenciation des CS qui produisent des androgènes, qui sont responsables de la différenciation des canaux de Wolff. A l'inverse, la régression des canaux de Wolff et la différenciation des canaux de Müller sont des évènements plutôt passifs et induits par le défaut de présence des facteurs masculinisant comme les androgènes. Ci-dessous nous décrivons les modes d'action de ces deux acteurs que sont AMH et les androgènes et leurs effets sur la formation du tractus urogénital.

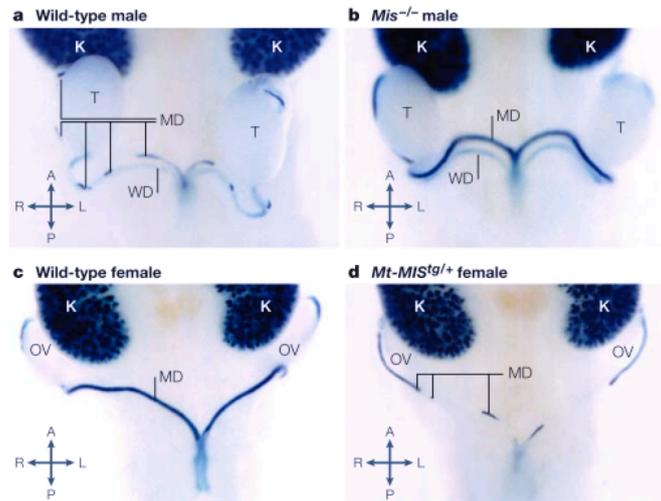


Figure 18 : Visualisation de la régression des canaux de Müller à 15,00jpc grâce à l'expression rapporteur LacZ exprimé sous le contrôle de *Lim1* (LIM homeobox 1)

- (a) Chez le mâle on observe que la régression des canaux de Müller a débuté. Les canaux de Müller sont fragmentés alors que les canaux de Wolff sont intacts.
- (b) L'invalidation d'*Amh* chez le mâle provoque une persistance des canaux de Müller.
- (c) Chez la femelle, les canaux de Müller persistent et les canaux de Wolff régressent.
- (d) Chez la femelle exposée à de fortes concentrations d'*Amh* les canaux de Müller régressent. T : testicules ; K : Rein ; L : gauche ; OV : Ovaire ; P : Postérieur ; R : Droite ; WD : Canaux de Wolff ; MD : Canaux de Müller

Issu de (Kobayashi and Behringer, 2003)

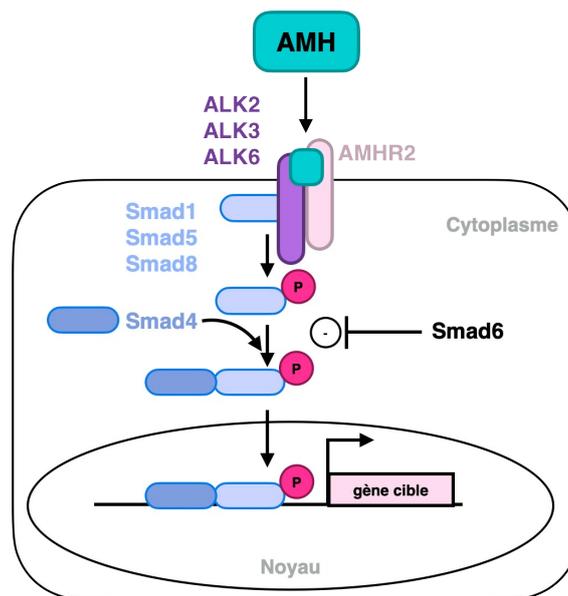


Figure 19 : Modèle pour l'activation de la voie de signalisation des Smads par AMH

AMH est d'abord sécrétée par les CS puis elle se lie à son récepteur AMHR2 à la surface des cellules mésenchymateuses des canaux de Müller. Cette liaison induit le recrutement d'un autre récepteur de type I, ALK. Le ou les récepteurs ALK recrutés vont phosphoryler SMAD 1, 5 et 8 qui forment ensemble un complexe qui va s'associer à Smad4 pour aller induire l'expression de gènes cibles dans le noyau. Adapté de (Josso and Di Clemente, 2003)

2. AMH et ses récepteurs

Amh est exprimé par les CS peu de temps après la différenciation sexuelle à partir de 12,50jpc puis, à la puberté, sous l'influence des androgènes, elle ne sera plus exprimée (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991 ; Behringer et al., 1994 ; Al-Attar et al., 1997). Chez le mâle, AMH est responsable de la régression des canaux de Müller qui débute entre 13,50jpc et 14,50jpc et prend fin à la naissance (Gao et al., 2006). Chez l'Homme, des mutations dans le gène codant pour *Amh* ou son récepteur *Amhr2* provoquent un syndrome appelé PDMS pour « persistent Müllerian duct syndrome ». Les hommes qui en sont atteints présentent un utérus, des trompes de Fallope, et souvent, une cryptorchidie (Picard et al., 2017).

Les mécanismes qui régissent la régulation de l'expression d'*Amh* par les CS sont décrits dans le paragraphe précédent (voir Chapitre I.2.1.A.e. *Amh* (*Anti-Müllerian Hormone*)).

L'invalidation d'*Amh* ou de son récepteur *Amhr2* conduit au même phénotype, à savoir une persistance des dérivés des canaux de Müller chez les mâles qui possèdent alors un utérus, un vagin et un oviducte. En plus des dérivés des canaux de Müller, ces mâles ont un système urogénital masculin normal, malgré une hyperplasie des CL indiquant une possible régulation négative d'*Amh* dans la prolifération des CL (Behringer et al., 1994 ; Mishina et al., 1996). L'exposition de souris mâles à des taux élevés d'*Amh* induit la féminisation des organes génitaux externes, une cryptorchidie et des défauts de différenciation des canaux de Wolff. Ces défauts sont causés par une carence en androgène induite par une mauvaise différenciation des CL suite à leur surexposition à AMH. Chez la femelle cette surexposition induit la régression des canaux de Müller, les individus sont alors dépourvus de vagin, d'utérus et d'oviducte (Behringer et al., 1990). Ces modèles murins ont permis de confirmer que c'est via *Amhr2* que *Amh* agit pour provoquer la régression des canaux de Müller. *Amhr2* est exprimé par les cellules mésenchymateuses des canaux de Müller mais aussi par les CS et les cellules de la granulosa durant la vie fœtale et après la naissance (di Clemente et al., 1994 ; Baarends et al., 1994 ; Arango et al., 2008) (**Figure 18**).

La régulation de l'expression d'*Amhr2* n'est pas encore totalement élucidée, mais plusieurs facteurs semblent y participer. *Wt1* fait partie de ces gènes. En effet, *Wt1* et *Amhr2* présentent un profil d'expression similaire dans les crêtes génitales. Par ailleurs, l'inactivation de *Wt1* provoque une diminution drastique de l'expression d'*Amhr2* et la persistance des canaux de Müller chez les mâles mutants. Il existe des sites de fixation de WT1 sur le promoteur d'*Amhr2* sur lesquels WT1 peut se fixer *in vitro* (Shimamura et al., 1997 ; Klattig et al., 2007a ; Klattig

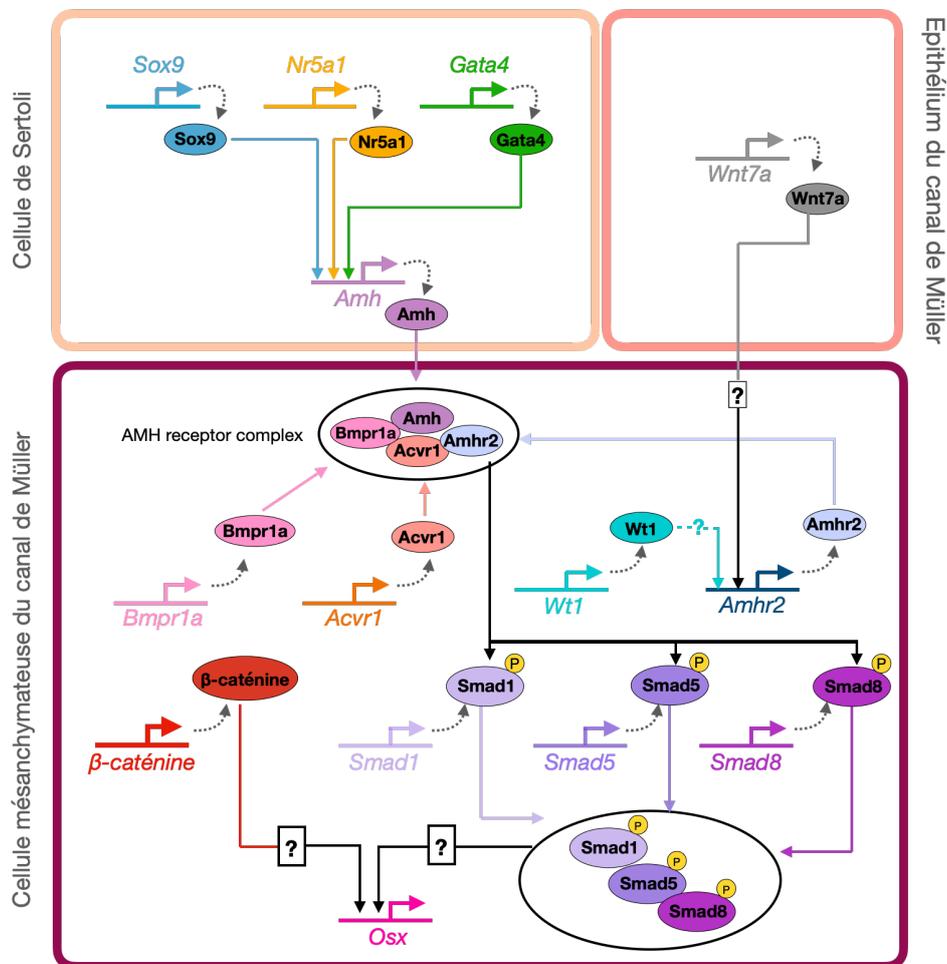


Figure 20 : Modèle proposé du réseau moléculaire qui régule la régression des canaux de Müller sous l'influence de l'expression d'*Amh*

Les cellules de Sertoli expriment *Amh* sous le contrôle de SOX9, NR5A1 et GATA4. Les cellules épithéliales du canal de Müller expriment *Wnt7* qui, de manière paracrine, va induire l'expression d'*Amhr2* dans les cellules mésenchymateuses. AMH va alors se fixer à son récepteur AMHR2 dans les cellules mésenchymateuses. Les récepteurs de type I *Bmpr1a* et *Acvr1* sont alors recrutés. Le complexe composé d'AMH et ses récepteurs conduira à la phosphorylation des SMAD 1, 5 et 8 qui permettront la transcription de gènes cibles. Ces gènes cibles des SMADs ne sont pas encore identifiés. Certaines études montrent aussi l'importance de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans cette régulation. Adapté de (Moses and Behringer, 2019)

et al., 2007b). De la même manière, *Wnt7a* (Wnt Family Member 7A), qui est exprimé dans l'épithélium des canaux de Müller, induit l'expression d'*Amhr2* dans les cellules mésenchymateuses de ces derniers. Son invalidation induit une persistance des canaux de Müller et une diminution de l'expression d'*Amhr2*. Cette diminution visualisée par hybridation *in situ* n'a lieu que dans le mésenchyme et pas dans la gonade, suggérant que *Wnt7a* a une influence sur les niveaux d'expression d'*Amhr2* uniquement dans les canaux de Müller (Parr and McMahon, 1998).

Amh fait partie des facteurs de croissance de la famille TGF- β ; à ce titre elle peut agir via deux types de récepteurs. Une fois fixée à son récepteur de type II (*Amhr2*), un récepteur de type I est recruté, il active enfin la voie de signalisation Smad qui permet de réguler l'expression de gènes cibles (Figure 19). Dans ce cadre, plusieurs modèles de souris invalidées ont été générés et ont permis de trouver les acteurs de l'activation cette voie de signalisation. Pour commencer, l'invalidation des récepteurs de type I, *Bmpr1a* (aussi appelé *Alk3* ; (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A) et *Acvr1* (Activin A Receptor Type 1) a été réalisée spécifiquement dans les cellules mésenchymateuses des canaux de Müller. L'invalidation de *Bmpr1a* conduit à la persistance des canaux de Müller chez la moitié des mâles mutants, sans affecter l'expression d'*Amh* ou *Amhr2*. L'invalidation de *Acvr1* ne provoque pas de phénotype ; les canaux de Müller régressent normalement chez les mutants. Par contre, l'invalidation simultanée de *Bmpr1a* et *Acvr1* induit une rétention des canaux de Müller chez tous les animaux mutants. Ces résultats impliquent une action redondante de *Bmpr1a* et *Acvr1* pour la régression des canaux de Müller, avec une importance fonctionnelle moindre pour *Acvr1* (Jamin et al., 2002 ; Orvis et al., 2008). Pour les Smads, (Sma- and Mad-related protein) la même stratégie d'invalidation a été mise en place. Ces études ont révélé que *Smad1*, *Smad5* et *Smad8* qui sont exprimés dans le mésenchyme des canaux de Müller, sont impliqués de manière conjointe dans la régression des canaux de Müller (Orvis et al., 2008)(Figure 19).

Enfin, il a été découvert que *Ctnnb1* a aussi un rôle dans la formation du canal de Müller et dans sa dégénérescence. Quand *Ctnnb1* est invalidée spécifiquement dans les cellules mésenchymateuses du canal de Müller, ce dernier apparaît moins condensé et persiste chez les mâles. Néanmoins, ce phénotype se fait indépendamment des niveaux d'expression d'*Amh* qui reste normaux chez les souris mutantes. Ce résultat indique que *Ctnnb1* agit en aval d'*Amh* pour induire la régression des canaux de Müller. Toutefois, il reste à déterminer quel ligand WNT est nécessaire à l'activation de cette voie de signalisation (Kobayashi et al., 2011).

Enfin, pour identifier de nouveaux gènes potentiellement induits par *Amh*, l'équipe de Richard Behringer a réalisé et analysé les résultats de RNA-seq de cellules mésenchymateuses

Gène invalidé	Phénotype induit par la perte de fonction	Référence
<i>Amh</i>	Persistance des canaux de Müller Hyperplasie des cellules de Leydig	Behringer et al., 1994
<i>Amhr2</i>	Persistance des canaux de Müller Hyperplasie des cellules de Leydig	Mishina et al., 1996
<i>Acvr1</i>	Régression des canaux de Müller	Orvis et al., 2008
<i>Bmpr1a</i>	Persistance des canaux de Müller dans 50% des cas	Jamin et al., 2002 Orvis et al., 2008
<i>β-caténine</i>	Persistance des canaux de Müller	Kobayashi et al., 2011
<i>Smad 1, 5 et 8</i>	Persistance des canaux de Müller	Orvis et al., 2008
<i>Wnt7a</i>	Persistance des canaux de Müller Baisse de l'expression d' <i>Amhr2</i>	Parr and McMahon, 1998
<i>Osx</i>	Retard de la régression des canaux de Müller	Mullen et al., 2018
<i>Wtl</i>	Persistance des canaux de Müller Baisse de l'expression d' <i>Amhr2</i>	Klattig et al., 2007

Table 3 : Gènes impliqués dans la régression des canaux de Müller et phénotypes observés lors de leurs invalidations respectives

de canaux de Müller issus d'embryons mâles et femelles. Grâce à la comparaison de ces données, ils ont identifié environ 80 gènes dont l'expression augmente chez le mâle durant la régression des canaux de Müller. Parmi eux, le gène *Osx* (ou *Sp7* ; Osterix) qui est connu pour jouer un rôle lors de la formation des os. Dans le cadre de la régression des canaux de Müller, l'expression de *Osx* est régulée à la baisse quand *Ctnnb1* est invalidée ou à la hausse quand on sur-exprime *Amh* chez la femelle. Néanmoins, l'invalidation de *Osx* n'entraîne qu'un retard de régression des canaux, indépendant du niveau d'expression d'*Amh*, qui est rattrapé à 18,50jpc (Mullen et al., 2018).

D'autres gènes dont l'expression est modifiée lors de l'invalidation d'*Amh* ou *Amhr2* ou de *Ctnnb1* ont été identifiés. Néanmoins, comme *Osx*, pour la plupart leur invalidation ne provoque pas de persistance des canaux de Müller. On peut en déduire que ce mécanisme de régression des canaux de Müller est très robuste car il fait intervenir un grand nombre d'acteurs redondants, dont l'inactivation de l'un est compensée par la présence des autres. De plus, pour induire un phénotype de persistance des canaux de Müller, il faut une diminution d'au moins 50% de l'expression d'*Amh* (Table 3 ; Figure 20).

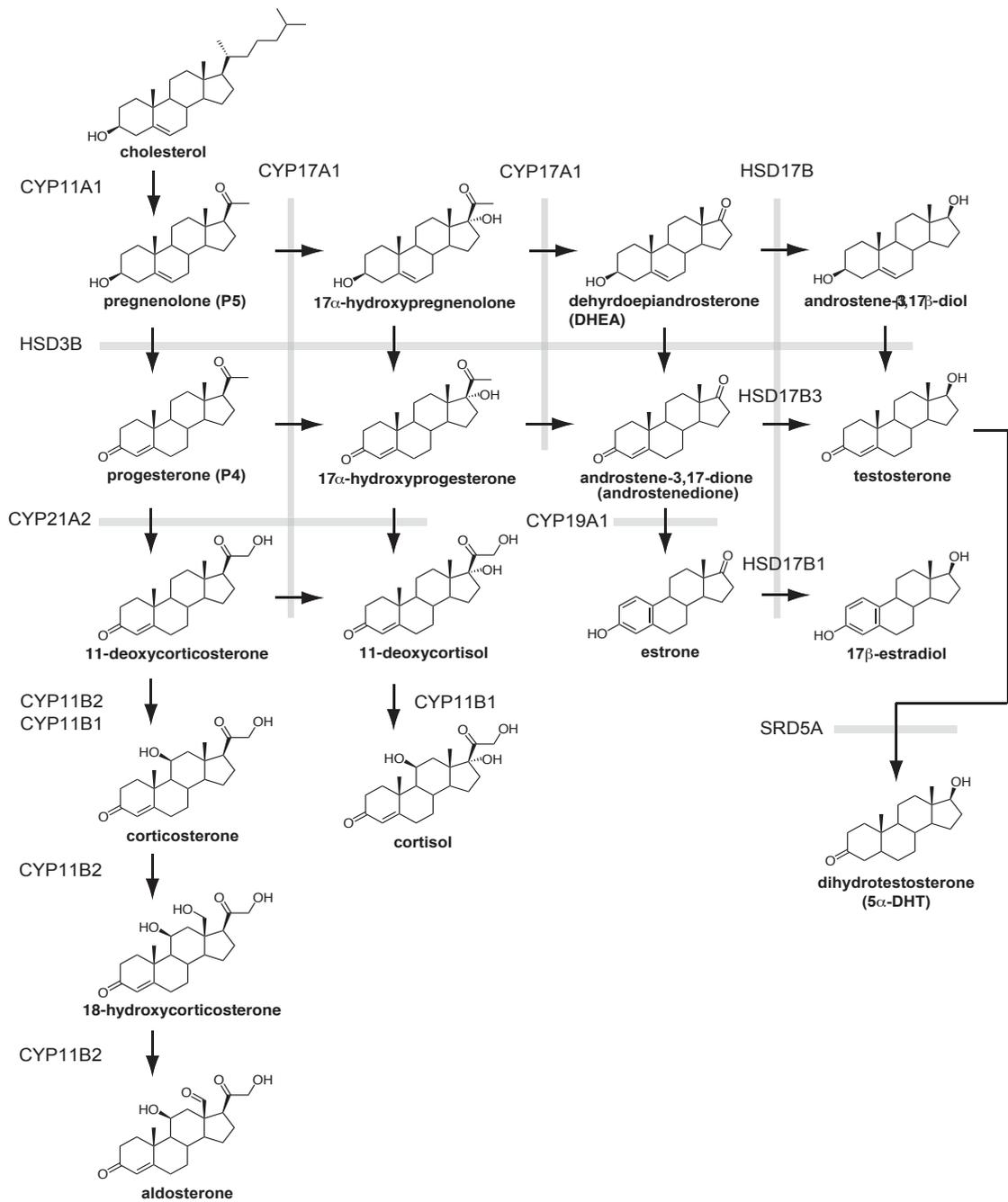


Figure 21 : Voie de la synthèse des stéroïdes sexuels
 Issu de (Morohashi et al., 2013)

3. La Testostérone et la Dihydrotestostérone

La testostérone est synthétisée à partir du cholestérol. Pour arriver à ce produit final, un certain nombre d'enzymes et de produits intermédiaires sont nécessaires (Miller WL, 1988)(Figure 21). Durant la vie fœtale, la testostérone est synthétisée grâce à la collaboration entre les CL et les CS. Les CL produisent l'androstènedione qui est transférée aux CS. Puis, les CS grâce à l'expression de *Hsd17b3*, convertissent l'androstènedione en testostérone (O'Shaughnessy et al., 2000 ; Shima et al., 2013)(Figure 21).

L'appareil urogénital mâle est issu de la différenciation de trois anlagen : les canaux de Wolff, le sinus urogénital (SUG) et le tubercule génital (TG) qui se différencient sous l'influence des androgènes (Figure 22). Les canaux de Wolff donnent naissance à l'épididyme, au canal déférent et aux vésicules séminales. Le SUG donne naissance, entre autres, à l'uretère, la prostate et la vessie. Enfin, le TG est le principal anlage pour les organes génitaux externes et donne naissance au pénis et à l'urètre. L'action des androgènes sur ces structures est rendue possible grâce à l'expression du récepteur des androgènes (AR). L'AR est exprimé dans les cellules mésenchymateuses de tout le tractus urogénital (Cooke et al., 1991 ; Takeda and Chang, 1991). Les cellules épithéliales du tractus urogénital n'expriment pas l'AR, néanmoins elles subissent des transformations dépendantes des androgènes. Il a donc été proposé qu'il existe des signalisations paracrines entre ces deux compartiments. En effet, lorsque le mésenchyme est dépourvu d'AR, la différenciation et la prolifération de l'épithélium n'ont pas lieu (Cunha et al., 1992). De nombreux modèles murins invalidés pour l'AR dans différents tissus mésenchymateux ou épithéliaux ont permis de mieux comprendre la dynamique de différenciation et les interactions qui régissent la morphogénèse de l'appareil urogénital mâle. Nous allons citer et décrire certains de ces modèles de manière non exhaustive.

Pour commencer, il existe un modèle naturel d'insensibilité aux androgènes retrouvé chez les rongeurs et chez l'homme. Chez l'homme ce syndrome est appelé « syndrome d'insensibilité aux androgènes » (Imperato-McGinley et al., 1990 ; McPhaul, 2002). Ces patients présentent un pseudohermaphrodisme avec des organes génitaux externes féminisés. Le modèle murin pour ce syndrome est appelé *Tfm* (testicular feminized mice) (Lyon and Hawkes, 1970 ; Yarbrough et al., 1990 ; Charest et al., 1991). Ces animaux présentent une régression des canaux de Wolff et sont insensibles aux traitements par la testostérone exogène. Des chercheurs ont alors souhaité générer un modèle d'insensibilité aux androgènes équivalent en utilisant le système Cre-lox. L'équipe de Chawnsang Chang y est parvenue en invalidant totalement l'AR chez la souris. Ces animaux invalidés présentent un phénotype extérieur

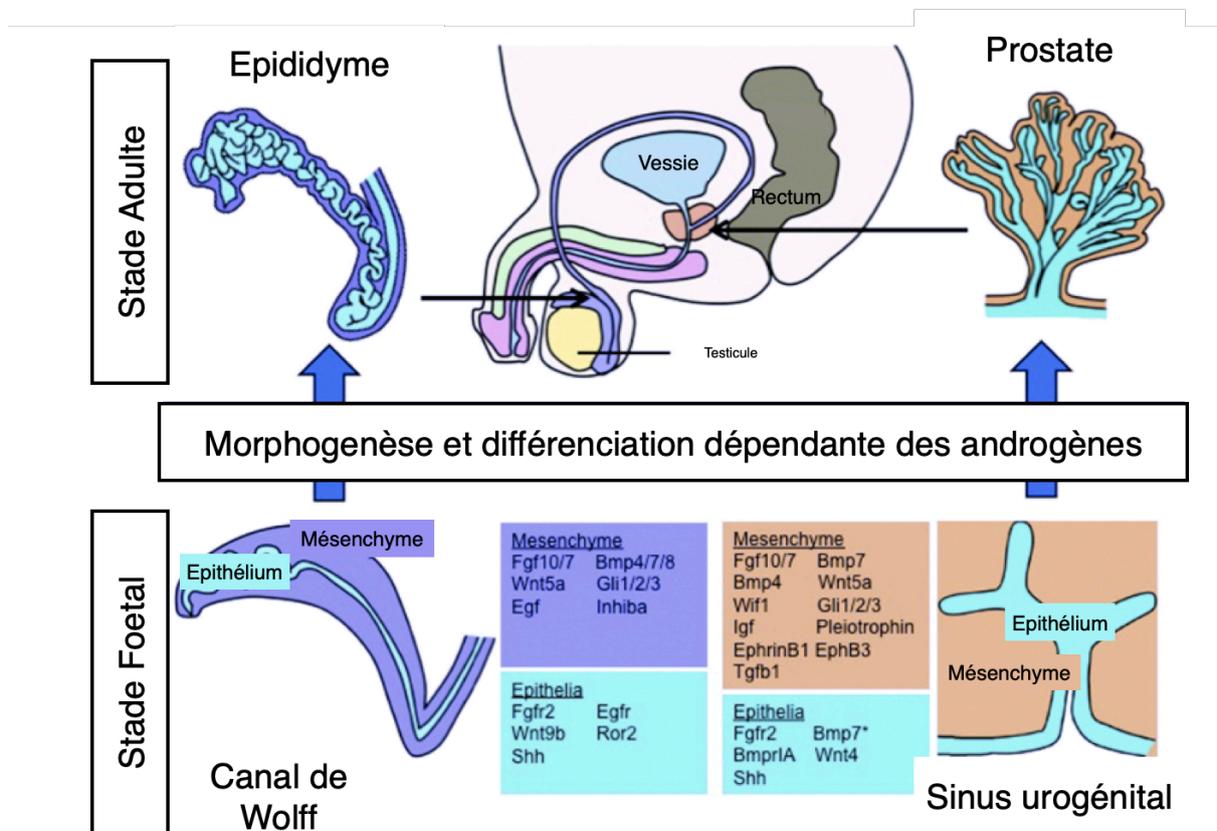


Figure 22 : Schéma de la masculinisation de l'épididyme et de la prostate en réponse aux androgènes

L'épithélium des canaux de Wolff persiste grâce à l'exposition aux androgènes, et l'épididyme s'allonge et s'enroule à partir du mésenchyme du canal de Wolff. La prostate se développe à partir du sinus urogénital. La testostérone et la DHT initient ces processus de développement grâce à AR exprimé par le mésenchyme. Une signalisation paracrine entre le mésenchyme et l'épithélium permet son développement.

Adapté de (Murashima et al., 2015)

féminisé avec un micropénis indiscernable d'un clitoris, un hypospadias (l'ouverture de l'urètre est située le long de la verge et pas à son extrémité) et un scrotum comparable aux grandes lèvres d'une femelle. Ces animaux présentent aussi une agénésie de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate et des canaux déférents. Les testicules sont plus petits et présentent une cryptorchidie. Il semble que les cellules germinales ne puissent pas terminer la spermatogénèse et s'arrêtent au stade pachytène de la méiose (Yeh et al., 2002). A partir de ce modèle utilisant la technologie Cre-lox, il a été possible de générer des invalidations conditionnelles. La génération de ces modèles a pour but de déterminer la fenêtre durant laquelle les androgènes sont nécessaires pour induire la différenciation des organes du système urogénital, et dans quel tissu l'AR doit être exprimé en fonction des organes étudiés.

Ainsi, l'inactivation sélective d'AR dans le mésenchyme prostatique ou dans les vésicules séminales provoque une diminution de la taille de ces organes mais aussi une altération de la prolifération des cellules épithéliales. Ces études constituent une preuve de plus que les cellules mésenchymateuses sont indispensables à la bonne différenciation des cellules épithéliales (Welsh et al., 2010 ; Welsh et al., 2011).

De la même manière, l'équipe de Martin Cohn a montré qu'invalider AR à 17,50jpc induit le développement d'un micropénis. Par contre, l'invalidation d'AR à 13,50jpc provoque une inversion du sexe total et un phénotype similaire aux souris *Tfm*. On peut en déduire que les androgènes sont indispensables pour la formation du pénis à partir de 17,50jpc (Zheng et al., 2015). Par ailleurs, dans cette étude les auteurs utilisent différentes recombinaisons Cre qui possèdent des efficacités et des spécificités cellulaires différentes, et donc induisent une diminution plus ou moins importante du nombre de cellules AR-positives. Ainsi, l'inactivation d'AR grâce à *ShhGfp-Cre* (qui est active dans les cellules épithéliales de l'urètre) n'affecte pas le développement du pénis. Par contre, l'utilisation de *Prx1Cre* (qui est active dans le mésenchyme du tubercule génital) provoque une diminution de 50% des cellules AR-positives et l'apparition d'un hypospadias. La *Dermo1Cre* (qui est aussi active dans le mésenchyme du tubercule génital) induit une diminution de 80% des cellules AR-positives et une inversion du sexe des organes génitaux externes. Cette étude permet de souligner l'importance d'une expression spatiale et temporelle précise d'AR, mais aussi quantitative (Zheng et al., 2015).

Durant la différenciation du TG, la signalisation induite par la testostérone n'est pas suffisante. En effet, pour la différenciation de la prostate et des organes génitaux externes la testostérone est convertie en dihydrotestostérone (DHT) par la 5alpha-réductase codée par le gène *Srd5a2* (Figure 21). La DHT est un androgène plus puissant car elle possède une meilleure affinité que la testostérone pour AR (Deslypere et al., 1992 ; Zhou et al., 1995). *Srd5a2* est

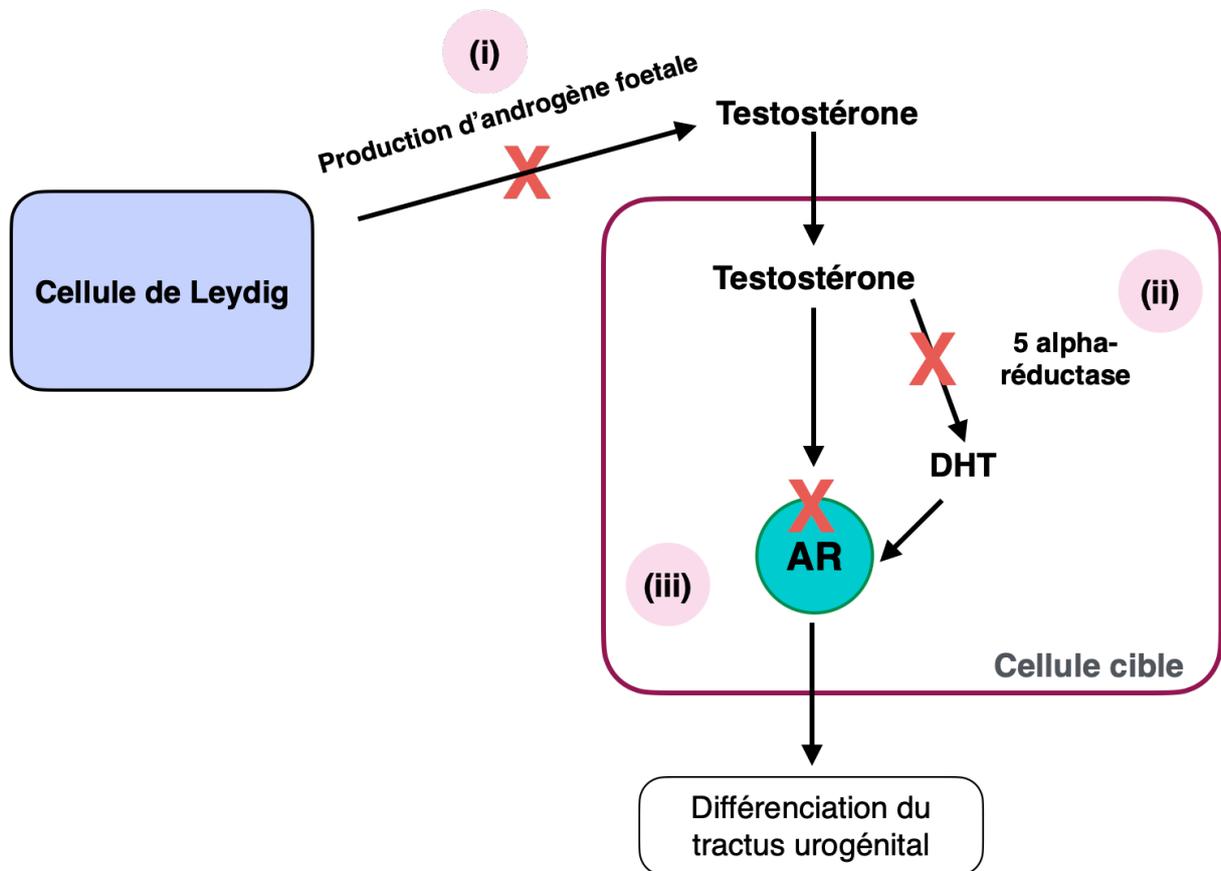


Figure 23 : Schéma représentant les défauts de signalisation des androgènes.

Les malformations du tractus urogénital mâle peuvent être causées par des défauts dans la voie de signalisation des androgènes qui peuvent être dus (i) à un défaut de production des androgènes par les CL ; (ii) à un défaut de conversion de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5 alpha-réductase ; (iii) à un défaut d'expression ou une mutation affectant le récepteur des androgènes : AR.

Adapté de (Welsh et al., 2014)

exprimé dans le mésenchyme du TG (Tsuji et al., 1994 ; Kim et al., 2002). Chez l'homme, des mutations dans le gène *Srd5a2* conduisent à un phénotype comparable à celui des souris invalidées pour l'AR. Ces patients présentent à la naissance des organes génitaux externes féminisés avec un micropénis semblable à un clitoris agrandi et deux ouvertures urétrale et vaginale distinctes (Imperato-Mcginley et al., 197 ; Andersson et al., 1991).

Les malformations du tractus urogénital mâle causées par un défaut de signalisation des androgènes peuvent être dues à une altération de l'expression spatiotemporelle d'AR ou à un défaut de conversion de la testostérone en DHT. Néanmoins, un défaut de production des androgènes peut aussi être la cause de ces malformations. C'est ce qui a été observé chez des patients porteurs de mutations dans les gènes *Star*, *Hsd3b2*, *Cyp17a1*, etc (Figure 23). Ainsi, l'inactivation de certaines enzymes responsables de la production de testostérone a été réalisée. L'inactivation de *Star* chez la souris induit une féminisation totale des organes génitaux externes, une hyperplasie des CL et une hypoplasie des vésicules séminales et de la prostate (Caron et al., 1997 ; Hasegawa et al., 2000). De la même manière, l'inactivation de *Cyp11a1* conduit à la féminisation des organes génitaux externes, les vésicules séminales et la prostate ne sont pas développées, alors que les canaux déférent et l'épididyme sont plus petits (Hu et al., 2002). Enfin ces mutants présentent une distance anogénitale (AGD) réduite. L'AGD représente la distance entre l'anus et la base du TG, elle est normalement deux fois plus longue chez le mâle que chez la femelle. Ainsi, cette étude constitue une preuve de plus que l'allongement de l'AGD est dépendant des androgènes (Graham and Gandelman, 1986 ; Ipulan et al., 2016).

Dans les années à venir, il restera à déterminer quelles sont les voies de signalisation activées en aval d'AR pour permettre la différenciation de chacun des organes du tractus urogénital. Toutefois, certaines pistes sont déjà en cours d'étude. En effet, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine semble jouer un rôle dans la différenciation du TG. Chez le mâle *Ctnnb1* est détectée dans le mésenchyme du TG, c'est à dire dans la partie dépendante d'AR. L'augmentation de l'expression de *Ctnnb1* dans le mésenchyme du TG chez la femelle induit une masculinisation des organes génitaux externes (apparition d'un prépuce). A l'inverse l'inactivation de *Ctnnb1* chez le mâle induit un défaut de formation du prépuce. Par ailleurs, chez la femelle, comme lors de l'inactivation de l'AR dans le mésenchyme du TG chez le mâle, on constate une augmentation de l'expression de *Dkk2* (Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 2), un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Miyagawa et al., 2009)(Figure 24). Lors de l'étude du développement de l'uretère il a aussi été constaté que la co-expression de *Tbx2* et *Tbx3* (T-box transcription factor 2/3) dans les cellules

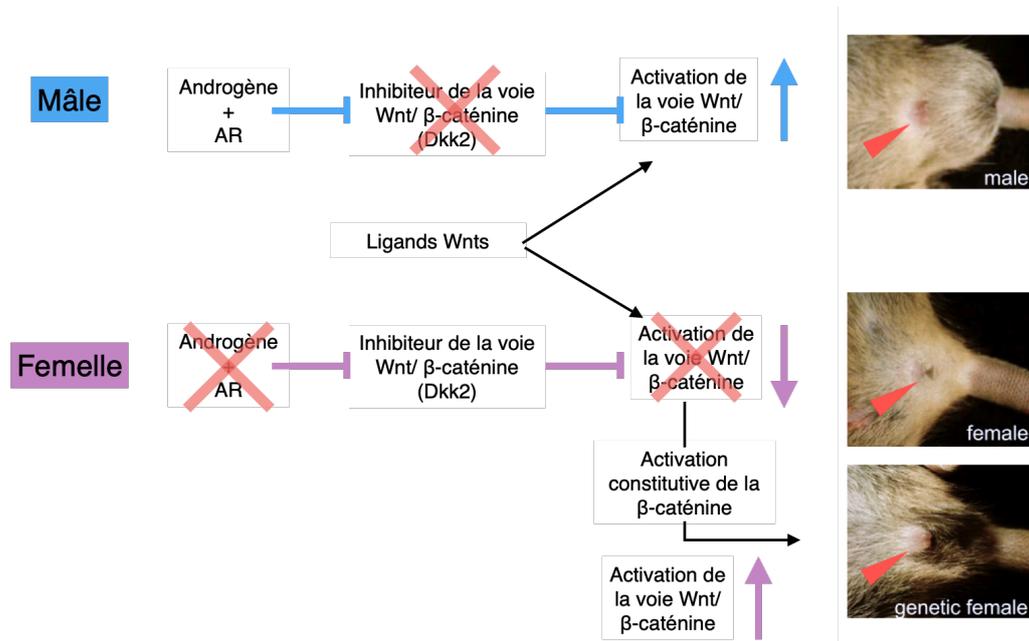


Figure 24 : Mode d'action proposé de la voie de signalisation Wnt/β-caténine en réponse aux androgènes

Chez le mâle les androgènes via leur récepteur AR, empêchent l'expression des inhibiteurs Wnt/β-caténine pour assurer l'activation de cette dernière et permettre la masculinisation des organes génitaux externes. Chez la femelle, en l'absence d'androgènes, les inhibiteurs de Wnt/β-caténine s'expriment et empêchent son activation. Chez la femelle l'augmentation de l'expression de la *Ctnnb1* et l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine induit une masculinisation des organes génitaux externes avec l'apparition d'un prépuce.

Adapté de (Miyagawa et al., 2009)

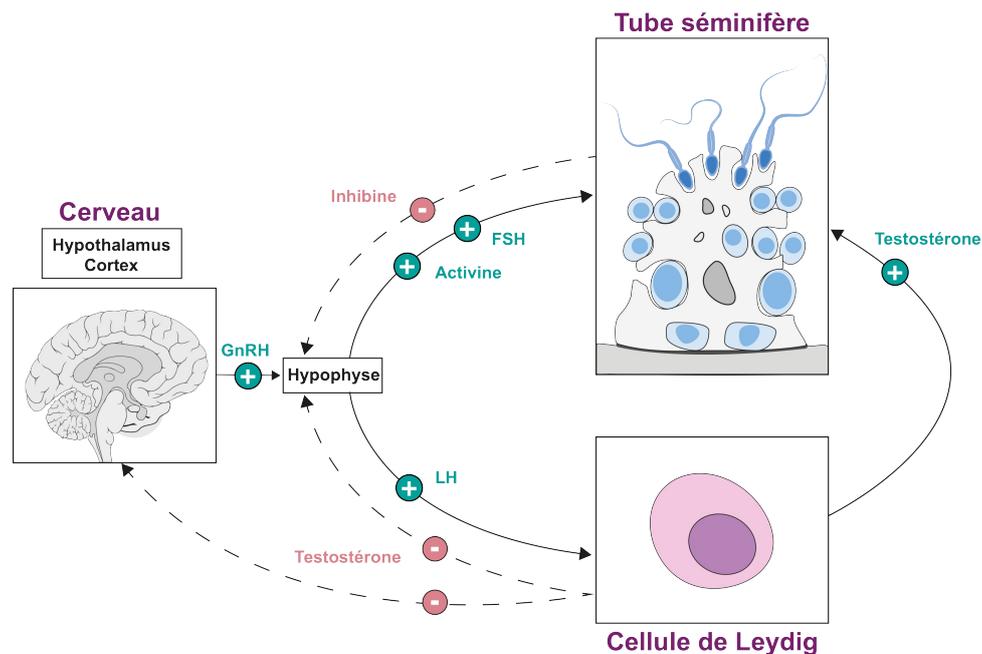


Figure 25 : L'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire

Issu de (Cocuzza and Agarwal, 2007)

mésenchymateuses est nécessaire pour l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. L'expression des effecteurs *Tbx2* et *Tbx3* va permettre d'empêcher l'expression des inhibiteurs de Wnt/ β -caténine, dont *Dkk2* fait partie pour permettre la différenciation adéquate du TG (Aydoğdu et al., 2018).

4. La mise en place de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire

L'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire qui se met en place chez le mâle est garant de la quantité d'hormones produites. De manière succincte, l'hypothalamus produit une neurohormone appelée GnRH (gonadotropin-releasing hormone). La GnRH permet de stimuler l'hypophyse qui, en réponse, produira deux gonadotrophines : FSH (follicle-stimulating hormone) et LH (Luteinizing hormone) (Kaiser et al., 1997). LH et FSH sont ensuite libérées dans la circulation sanguine avant d'atteindre leurs cibles respectives. LH va se fixer à ses récepteurs exprimés par les CL, alors que FSH a pour cible les CS. Les LC stimulées par LH vont produire de la testostérone en réponse. Les CS produiront des protéines comme l'inhibine et l'activine. Ces protéines interviennent dans le rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire et dans le contrôle de la spermatogénèse (Burger et al., 2004). L'activine stimule la production de FSH, alors que l'inhibine et la testostérone sont responsables du rétrocontrôle négatif de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire (Gregory and Kaiser, 2004)(**Figure 25**).

Chapitre III
Le récepteur nucléaire
NR5A1

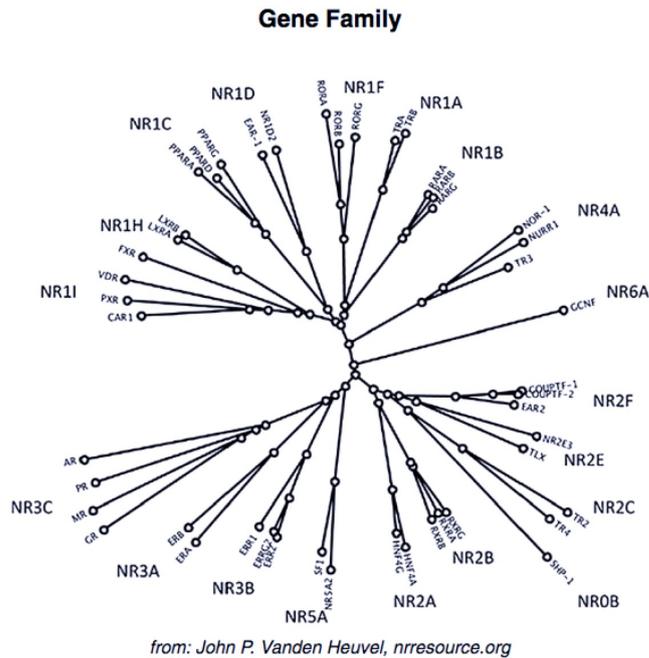


Figure 26 : Arbre phylogénique des récepteurs nucléaires
 Issu de (Hermann-Kleiter and Baier, 2014)

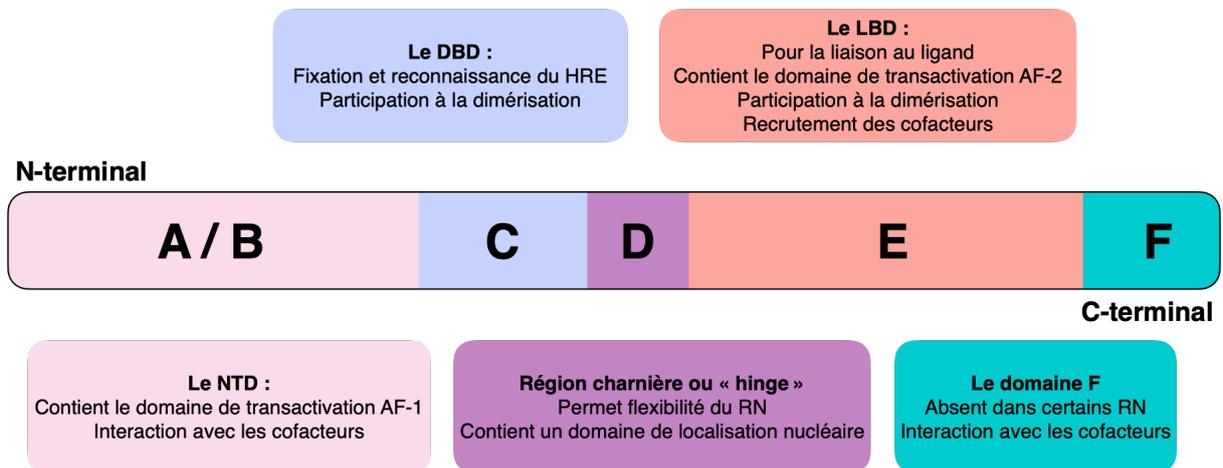


Figure 27 : Schéma général de la structure des récepteurs nucléaires et leurs domaines

Les récepteurs nucléaires (RN) sont tous organisés en domaines fonctionnellement autonomes. Ils sont plus ou moins conservés entre les récepteurs nucléaires. Le domaine A/B aussi appelé NTD (N-terminal domain) est très variable entre les RNs. Il contient un domaine d'activation de la transcription (AF-1) indépendant de la fixation du ligand et est impliqué dans l'interaction avec les cofacteurs. Le domaine C appelé DBD (DNA binding domain) est très conservé, il est chargé de la reconnaissance et de la fixation des RNs à l'ADN sur les séquences cibles appelées HRE (Hormone-Response Element). Le DBD participe aussi à la dimérisation des RNs. Le domaine D ou région charnière est un lien flexible pour les changements de conformation des RNs et il peut aussi contenir un signal de localisation nucléaire. Le domaine E aussi appelé LBD (Ligand Binding Domain) permet la fixation du ligand à son RN. Il contient un domaine d'activation AF-2 dont l'activité est dépendante du ligand. Le LBD permet aussi le recrutement de cofacteurs et participe à la dimérisation des RNs. Le domaine F est peu conservé entre les RNs et peut être absent chez certains. Il est impliqué dans les interactions avec les cofacteurs ou la dimérisation des RNs.

Chapitre III : Le récepteur nucléaire NR5A1

1. Généralités sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (RN) font partie de la superfamille des facteurs de transcription. Ils nécessitent d'être activés par leurs ligands pour réguler positivement ou négativement la transcription de leurs gènes cibles. Par conséquent, les RNs sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques (Liu et al., 2015). A ce jour, 49 RNs ont été identifiés chez la souris et 48 RNs chez l'homme. Les années suivant la découverte des RNs, plusieurs classifications et dénominations ont été publiées. En 1999, une classification internationale a été proposée, elle a permis d'assigner un nom officiel à chaque RN. Cette classification proposée par le Nuclear Receptors Nomenclature Committee est basée sur l'évolution des deux domaines les plus conservés entre les RNs : le domaine de liaison à l'ADN (ou DBD pour DNA binding domain) et le domaine de liaison du ligand (ou LBD pour ligand binding domain). En fonction de la conservation de ces séquences, la superfamille des RNs a été subdivisée en 6 sous-familles allant de NR1 à NR6 (**Figure 26**) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Les noms attribués aux RNs se présentent sous la forme « NRABC » où :

- A désigne le numéro de la sous-famille
- B désigne le groupe auquel il appartient
- C désigne le numéro du RN dans son groupe.

Ainsi, NR5A1 fait partie de la 5^{ème} sous-famille des RNs et est le 1^{er} du groupe A.

Les RNs possèdent une organisation modulaire dans laquelle les domaines qui les constituent sont fonctionnellement autonomes. Les RNs possèdent tous, à l'exception de la sous-famille NR0, 6 domaines nommés de A à F en partant la partie N-terminale (**Figure 27**). La dernière sous-famille NR0 est constituée des RNs qui ne possèdent pas le domaine de liaison du ligand ou à l'ADN (Robinson-Rechavi et al., 2003).

1.1 Le domaine A/B ou NTD

Le premier domaine A/B aussi appelé NTD (N-terminal domain) est localisé à l'extrémité N-terminale. C'est le domaine qui, du point de vue de la séquence et de la longueur, est le plus variable entre les RNs. Il contient un sous-domaine d'activation de la transcription appelé AF-

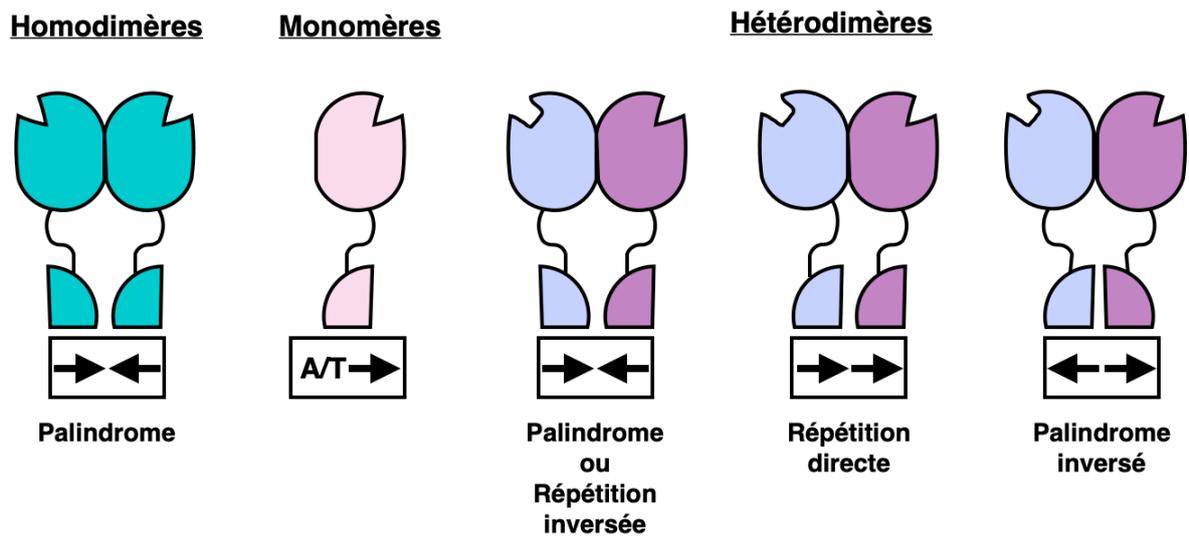


Figure 28 : Liaison des récepteurs nucléaires aux éléments de réponse HRE (Hormone-Response Element)

Les récepteurs nucléaires peuvent se lier en tant que monomères, homodimères ou hétérodimères à l'ADN. La manière dont les récepteurs constituant les hétérodimères vont se placer l'un par rapport à l'autre est dépendante de l'organisation des HRE. Ils peuvent être organisés en palindrome, en répétition directe ou en palindrome inversé. Les monomères n'ont besoin que d'une séquence du HRE précédée d'une séquence riche en A/T pour se fixer à l'ADN. Les homodimères se fixent à des séquences organisées en palindrome.

Adapté de (Aranda and Pascual, 2001)

1 (activation function 1). AF-1 possède une activité indépendante du ligand et agit pour recruter des cofacteurs (Bocquel et al., 1989). Par exemple, dans le cas du récepteur des androgènes, le NTD interagit avec le LBD pour permettre la liaison avec des cofacteurs (He et al., 2000).

1.2 Le domaine C ou DBD

Le second domaine, le domaine C, aussi appelé DBD (DNA binding domain), est le plus conservé entre les RNs et est composé d'une soixantaine d'acides aminés. Il est responsable de la reconnaissance et de la fixation des RNs à l'ADN. Les sites de fixations des RNs sont situés au niveau de séquences consensus à proximité de leurs gènes cibles et sont appelés éléments de réponses aux hormones ou HRE (Hormone-Response Element) (Freedman et al., 1988 ; Helsen et al., 2012).

Les HRE sont formés de deux séquences hexa-nucléotidiques dont deux types ont été identifiés « AGAACA » et « AGGTCA ». Les récepteurs nucléaires agissent la plupart du temps en se dimérisant soit avec un RN différent en formant un hétérodimère, soit avec le même RN formant ainsi un homodimère, soit sans se dimériser en agissant seul sous forme de monomère. Lors de la dimérisation des RNs, chaque RN se fixe à une des deux séquences du HRE. La proximité entre les deux séquences constituant le HRE permet une interaction directe entre les RNs du dimère. Par ailleurs, la manière dont ces séquences sont organisées l'une par rapport à l'autre a une influence sur la dimérisation des RNs qui s'y fixent (**Figure 28**). La fixation des RNs à l'ADN est possible grâce à la présence de deux doigts de domaines doigts de zinc. Le premier permet la reconnaissance spécifique du HRE alors que le second a une affinité moindre pour l'ADN et a pour rôle de stabiliser la dimérisation du RN et sa fixation à l'ADN (Freedman et al., 1988 ; Schena and Yamamoto, 1988). De plus, un certain nombre de RNs possèdent une extension d'environ 20 acides-amino dans la partie C-terminale du DBD qui est appelée CTE (C-terminal extension region). La séquence de cette extension n'est pas conservée entre les RNs mais, pour tous ceux qui la possèdent, elle permet d'étendre les sites de contacts entre les RNs et le petit sillon de l'ADN afin de stabiliser et renforcer leur liaison (Aranda and Pascual, 2001).

1.3 Le domaine D ou région charnière

Le domaine D, aussi appelé région charnière ou « hinge », peut avoir une taille et une séquence très variables entre les RNs. Ce domaine constitue un lien flexible qui permet

l'orientation structurale entre le LBD et le DBD et entre le DBD et l'ADN (Germain et al., 2006). Pour un certain nombre de RNs ce domaine contient un signal de localisation nucléaire et est le lieu de multiples modifications post-traductionnelles. Ces modifications permettent notamment le recrutement de cofacteurs (Ylikomi et al., 1992 ; Anbalagan et al., 2012). Enfin, en fonction des RNs, le rôle de ce domaine peut dépendre de la position de certains résidus ou dépendre de sa taille (Shaffer et al., 2005 ; Held et al., 2012 ; Tanner et al., 2010). Par exemple pour le récepteur de la vitamine D, la longueur de la séquence semble être importante mais pas sa séquence pour l'activation de la transcription (Shaffer et al., 2005). A l'inverse, le remplacement de certains résidus du domaine D du récepteur des hormones thyroïdiennes empêche l'interaction avec des corépresseurs (Damm et al., 1993).

1.4 Le domaine E ou LBD

Le domaine E aussi appelé LBD (Ligand Binding Domain) est le domaine de liaison du ligand. Il contient un domaine d'activation AF-2 (activation fonction 2) dont l'activation dépend de la fixation du ligand. Le LBD est composé de 12 hélices alpha. La fixation du ligand au LBD induit un changement de position de la douzième hélice qui permettra la fixation des coactivateurs nécessaires à l'activation de la transcription du gène cible. En l'absence de ligand, l'hélice 12 prendra une conformation différente qui permettra alors le recrutement des corépresseurs (Parker and White, 1996 ; Heldring et al., 2007 ; Weikum et al., 2018). Le LBD est aussi nécessaire à la dimérisation des RNs (Nagpal et al., 1993). Le LBD est assez variable surtout en ce qui concerne la poche de fixation du ligand, cette variabilité illustre la grande diversité des ligands existants.

1.5 Le domaine F

Enfin le domaine F est peu conservé entre les RNs. Il est même absent chez certains. Il est impliqué dans les interactions avec les cofacteurs ou dans la dimérisation des RNs (Wärnmarkt et al., 2001 ; Skafar and Zhao, 2008).

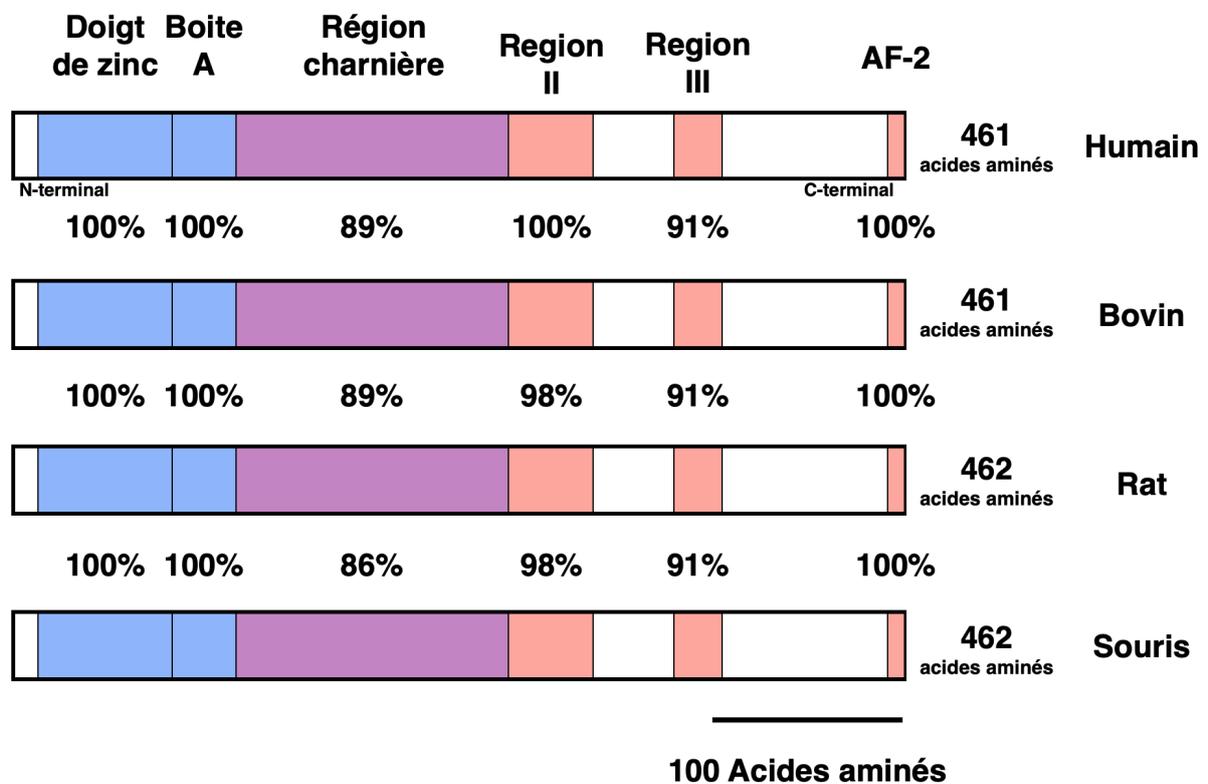


Figure 29 : Conservation de différentes régions de NR5A1 entre les espèces

Les domaines fonctionnels de NR5A1 chez l'homme, le bovin, le rat et la souris sont représentés à l'échelle. Les nombres au-dessus de chaque domaine indiquent le pourcentage d'identité dans chaque domaine par rapport à la séquence humaine. Les nombres à l'extrémité carboxyle indiquent le nombre total d'acides aminés pour chaque espèce.

Adapté de (Parker and Schimmer, 1997)

2. NR5A1

2.1 Structure

Nr5a1 est localisé sur le deuxième chromosome de la souris et sur le chromosome 9 chez l'homme (Taketo et al., 1995). NR5A1 est constitué des domaines retrouvés classiquement chez les RNs (présentés paragraphe au précédent). Il possède néanmoins quelques spécificités comme le fait que son domaine d'activation indépendant du ligand AF-1 ne soit pas situé dans le domaine NTD mais entre le domaine de liaison à l'ADN et la région charnière (Li et al., 1999 ; Lewis et al., 2008).

Son domaine de fixation à l'ADN, DBD est très conservé entre les espèces (**Figure 29**) (Parker and Schimmer, 1997 ; Pawlak et al., 2012). Il contient deux doigts de zinc dont le premier comporte un domaine appelé boîte P qui aura la charge de reconnaître et de se lier à la séquence hexa-nucléotidiques consensus « AGGTCA » (Wilson et al., 1993). A l'extrémité C-terminale du DBD, on retrouve l'extension appelée CTE (C-terminal extension region) présente chez les RNs capables d'agir sous forme de monomère comme c'est le cas pour NR5A1. Cette région est située juste après le second doigt de zinc et est appelée boîte A ou boîte FTZ-F1 (Ueda et al., 1992). La boîte A permet la reconnaissance de séquence nucléotidique adjacente à la séquence consensus. Ce site de fixation supplémentaire ainsi que la coopération entre les boîtes A et P, permettent une liaison plus stable et de fortes affinités entre le monomère NR5A1 et l'ADN (Wilson et al., 1993 ; Little et al., 2006 ; Helsen et al., 2012).

Par ailleurs, NR5A1 a la particularité de faire partie des récepteurs nucléaires orphelins. Les RNs sont dits orphelins quand leurs ligands n'ont pas encore été identifiés. Ainsi, NR5A1 est capable d'être activé sans la fixation d'un ligand, il est constitutivement actif (Wilson et al., 1993 ; Lu et al., 2013). NR5A1 possède néanmoins un site de fixation du ligand, LBD, structuré classiquement en 12 hélices et comportant un domaine d'activation AF-2. Pour les RNs possédant un ligand ce domaine AF-2 est essentiel à l'activation de la transcription dépendante de la fixation du ligand (Parker and Schimmer, 1997 ; Pawlak et al., 2012). Dans le cas de NR5A1, AF-2 est important pour le recrutement des cofacteurs (Schimmer and White, 2010 ; Park et al., 2007).

2.2 Ligands hypothétiques

Comme mentionné précédemment, NR5A1 est considéré comme un récepteur nucléaire orphelin car aucun ligand de haute affinité n'a pu lui être associé. Par ailleurs, les hélices 1 et 12 de NR5A1 sont capables d'adopter une conformation active en l'absence de ligand (Desclozeaux et al., 2002). On considère alors que son activité est plutôt modulée par des modifications post-traductionnelles et par l'association de cofacteurs (Wilson et al., 1993 ; Lu et al., 2013). Néanmoins, des molécules capables de se lier au LBD de NR5A1 et de moduler son activité transcriptionnelle ont été identifiées. La multiplication des études de cristallographie et de spectrométrie de masse ont permis d'étudier plus précisément les ligands potentiels de NR5A1 et ses changements de conformation dans différents contextes.

Il a été découvert que des phospholipides sont capables de se loger dans la poche du LBD de NR5A1 (Forman, 2005). Ces phospholipides peuvent être d'origine bactérienne (comme la phosphatidyl éthanolamine ou la phosphatidylglycérol) ou mammifère (comme la phosphatidylcholine ou la phosphatidylinositol phosphate) (Krylova et al., 2005 ; Sablin et al., 2009). Pour comprendre le rôle de ces phospholipides sur l'activité de NR5A1, des mutations empêchant la liaison des phospholipides par diminution de la taille de la poche du LBD, ou induction de mutations ponctuelles des sites de liaison ont été réalisées. La perte de liaison avec les phospholipides provoque l'incapacité de NR5A1 à recruter ses coactivateurs et induit une baisse significative de son activité transcriptionnelle (Forman, 2005 ; Li et al., 2005).

Plus tard, en recherchant de nouveaux phospholipides endogènes, l'équipe de Marion B. Sewer a découvert que la sphingosine est aussi capable de se lier à NR5A1. Contrairement aux phospholipides, la sphingosine est un antagoniste naturel de NR5A1. En effet, la liaison de la sphingosine sur NR5A1 induit une baisse de l'expression de son gène cible *Cyp17* dans des cultures de cellules surrénales humaines (Urs et al., 2006). La sphingosine induit une baisse de l'activité de NR5A1 en favorisant l'action de corépresseur tel que NCOR2 (nuclear receptor co-repressor 2 aussi appelé SMRT). De plus, il a été observé que des niveaux d'AMPc élevés permettent d'augmenter l'activité de NR5A1 en provoquant le catabolisme de la sphingosine (Urs et al., 2006 ; Dammer et al., 2007).

Des études ont permis de déterminer le lien entre la liaison des phospholipides, les modifications post-traductionnelles et l'activation de la transcription par NR5A1. Ce dernier possède un site de phosphorylation sur sa Sérine 203. Cette phosphorylation est réalisée par la kinase CDK7 (cyclin-dépendent kinase 7) qui fait partie d'un complexe de coactivateurs de la transcription TFIIH. Des mutations empêchant l'interaction entre le LBD et les phospholipides

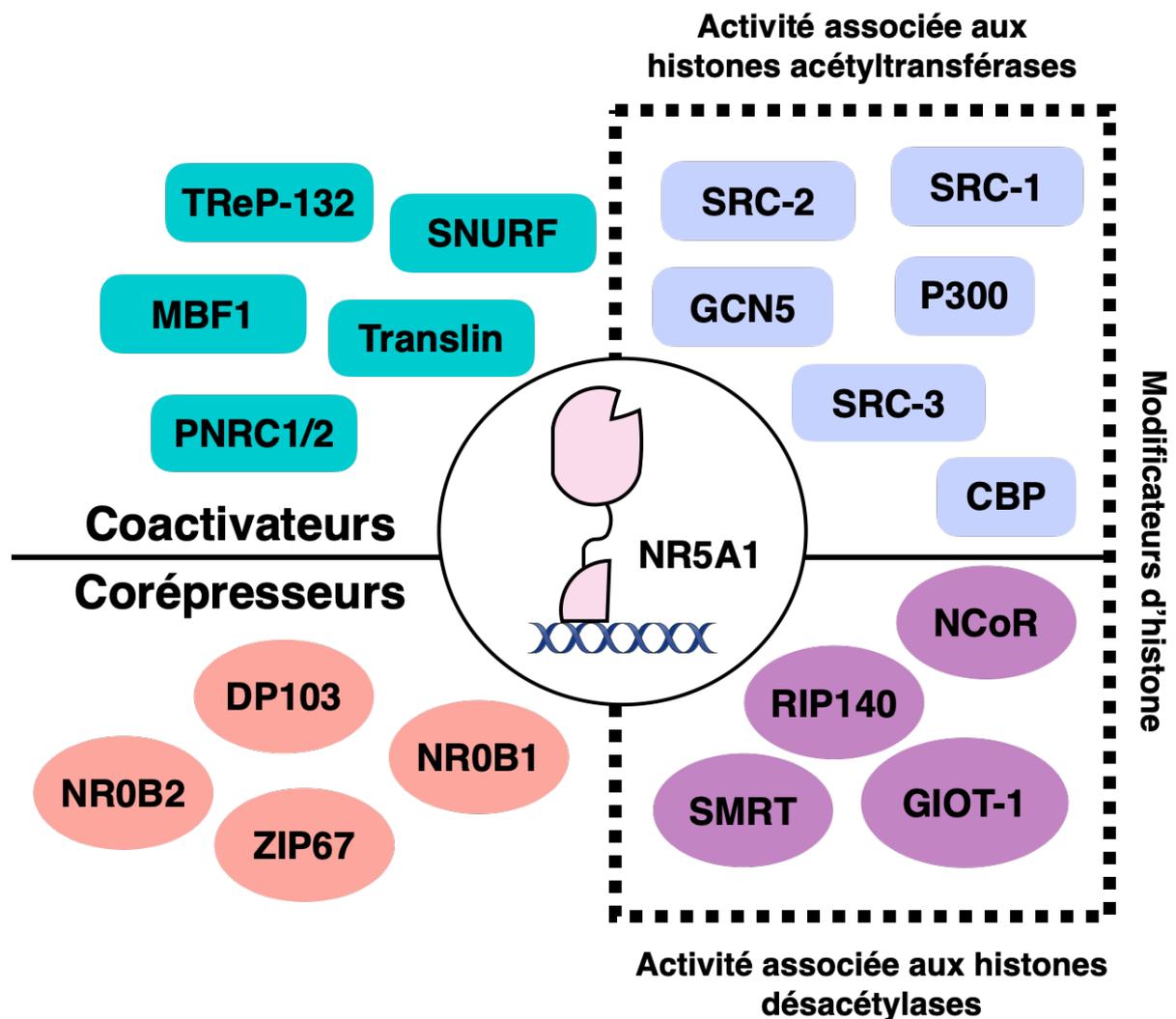


Figure 30 : Représentation schématique de la liste non exhaustive des protéines qui interagissent avec NR5A1 pour réguler son activité transcriptionnelle

Les coactivateurs de NR5A1 sont représentés par des rectangles et les corépresseurs par des ovales. Les coactivateurs sont associés à l'action de histones acétyltransférases qui permettent de décondenser la chromatine pour la rendre accessible à la machinerie transcriptionnelle. A l'inverse les corépresseurs recrutent des histones désacétylases pour condenser la chromatine.

Adapté de (Hoivik et al., 2010)

induisent une diminution de la phosphorylation et de l'activité transcriptionnelle de NR5A1. Ainsi, ces résultats traduisent le fait que la liaison avec des phospholipides provoque le recrutement des protéines responsables de modifications post-traductionnelles et de coactivateurs qui permettent à leur tour l'activation de la transcription des gènes cibles (Lewis et al., 2008). Par ailleurs, ces recrutements ne sont pas dépendants des changements de conformation de NR5A1 puisqu'on sait que la liaison des phospholipides ne modifie pas la conformation globale du LBD (Sablin et al., 2009).

Nr5a1 est exprimé à différents moments et dans de nombreux organes. NR5A1 agit la plupart du temps de manière dose-dépendante dans les processus biologiques dans lesquels il est impliqué. Malgré la découverte de molécule pouvant se lier à son LBD, NR5A1 est toujours considéré comme un RN orphelin. En effet, contrairement aux ligands classiques ces molécules ne modifient pas la conformation de NR5A1 pour l'activer mais ils participent au recrutement de cofacteurs responsables de modifications post-traductionnelles qui modulent son activité. Ainsi, les molécules pouvant se lier au LBD de NR5A1 peuvent être considérées comme des régulateurs qui permettent une modulation plus fine de son activité en fonction des organes ou des processus biologiques.

2.3 Mode d'action de NR5A1 et ses corégulateurs

NR5A1 agit comme la plupart des RNs pour activer ou réprimer la transcription de ses gènes cibles. En effet, en fonction du contexte NR5A1 recrutera soit des coactivateurs soit des corépresseurs (**Figure 30**). Ce recrutement est rendu possible grâce à des modifications post-traductionnelles ou grâce à la liaison de NR5A1 à liaison des phospholipides. Ces corégulateurs agiront ensuite sur la structure de la chromatine en y modifiant les marques d'histones. Ainsi, une chromatine condensée est moins accessible à la machinerie transcriptionnelle et provoque une répression de la transcription. A l'inverse une chromatine décondensée sera plus accessible et permettra l'expression du gène cible (Brendel et al., 2002).

Comme corépresseurs de NR5A1 on retrouve les deux RNs du groupe NR0 à savoir NR0B1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1, aussi appelé DAX1) et NR0B2 (Small heterodimer partner aussi appelé SHP).

NR0B2 a la capacité de réprimer l'activité transcriptionnelle de NR5A1 en se fixant à son domaine AF-2 (Li et al., 2005). De manière intéressante, NR5A1 est capable de se fixer sur le promoteur de NR0B2 pour induire son expression créant ainsi une boucle de régulation négative de l'activité de NR5A1 (Lee et al., 1999).

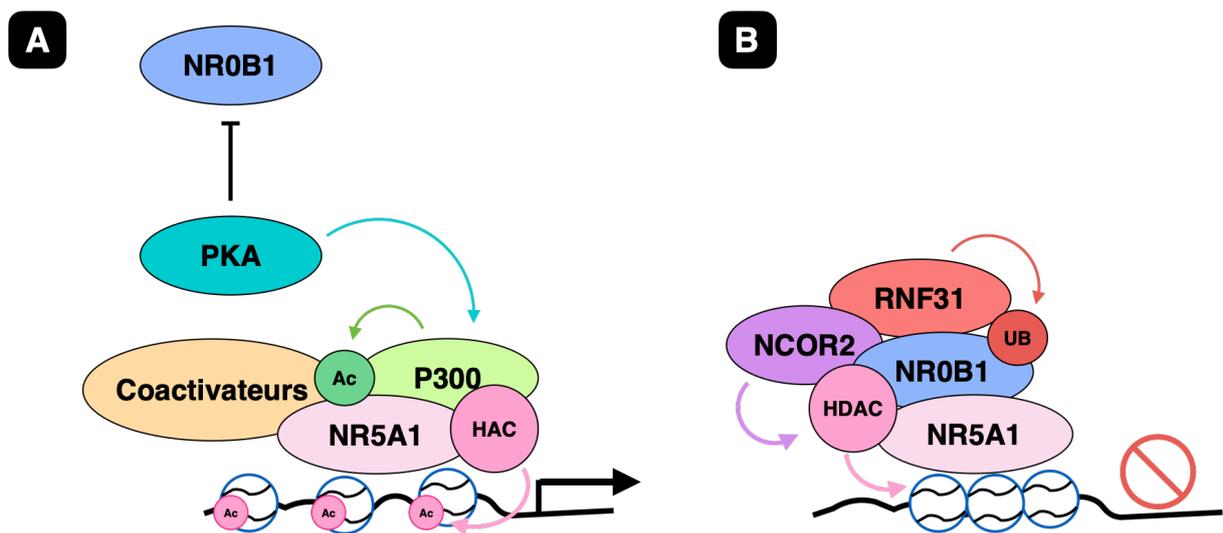


Figure 31 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NR5A1 par NR0B1

(A) La protéine kinase A (PKA) empêche la fixation de NR0B1 à NR5A1. Elle permet aussi le recrutement de P300 qui a pour rôle d'acétyler NR5A1. L'acétylation de NR5A1 lui permet d'augmenter son ancrage à l'ADN et de recruter des coactivateurs mais aussi des histones acétyltransférases (HAC) qui décondense la chromatine en acétylant les histones.

(B) En l'absence de PKA, NR0B1 se fixe au domaine AF-2 de NR5A1. L'ubiquitination de NR0B1 est réalisée par RNF31 (Ring Finger Protein 31) et permet sa stabilisation. NR0B1 permet alors le recrutement de NCOR 2 (aussi appelé SMRT). NCOR va à son tour recruter des histones désacétylases. Le retrait de ces marques d'histone provoque une condensation de la transcription qui empêche le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

NR0B1 quant à lui est aussi capable de se lier au domaine AF-2 de NR5A1 pour inhiber son activité transcriptionnelle (Babu et al., 2002 ; Suzuki et al., 2002). Une fois lié NR0B1 va recruter des corépresseurs appelés NCOR (nuclear receptor co-repressor) qui mobiliseront à leur tour des histones désacétylases responsables de la condensation de la chromatine et donc de son inaccessibilité (Crawford et al., 1998). La fixation de NR0B1 est améliorée par RNF31 (Ring Finger Protein 31) qui procède à son ubiquitination (Ehrlund et al., 2009). L'action de NR0B1 peut être inhibée grâce à des concentrations élevées en AMPc. En effet, l'AMPc agit via la protéine kinase A (PKA) pour provoquer l'acétylation de NR5A1 par P300 (histone acetyltransferase P300). L'acétylation de NR5A1 favorise les liaisons avec ses coactivateurs et augmente son ancrage à l'ADN (Chen et al., 2005). Dans le même temps PKA empêche la liaison de NR0B1 à NR5A1 (Fan et al., 2004)(**Figure 31**). Ces études permettent de mettre en lumière l'importance des modifications post-traductionnelles dans la régulation de l'activité des RNs.

Il existe aussi des cofacteurs qui agissent sans induire de modification de la structure de la chromatine. C'est le cas de MBF-1 (Multiprotein bridging factor) qui est aussi un coactivateur de NR5A1. En effet, MBF-1 se lie à NR5A1 et va permettre le recrutement de la machinerie transcriptionnelle sans modification de la chromatine (Kabe et al., 1999 ; Brendel et al., 2002).

2.4 Processus biologiques et pathologies impliquant *Nr5a1*

Durant le développement embryonnaire et jusqu'à l'âge adulte NR5A1 est impliqué dans de nombreux processus biologiques. En effet, chez la souris *Nr5a1* est exprimé dans le primordium gonado-surrénalien, dans les cellules de Sertoli et de Leydig, dans le système nerveux central, dans les glandes surrénales ou encore dans le placenta (Luo et al., 1994 ; Ikeda et al., 1996 ; Sadovsky et al., 1995). Nous allons ici décrire plusieurs de ces implications de manière non exhaustive en nous focalisant surtout sur son rôle pour maintenir les fonctions reproductives.

A. La stéroïdogénèse

La stéroïdogénèse désigne le processus par lequel les hormones stéroïdiennes sont produites à partir du cholestérol en majorité par le testicule et les glandes surrénales. Durant le

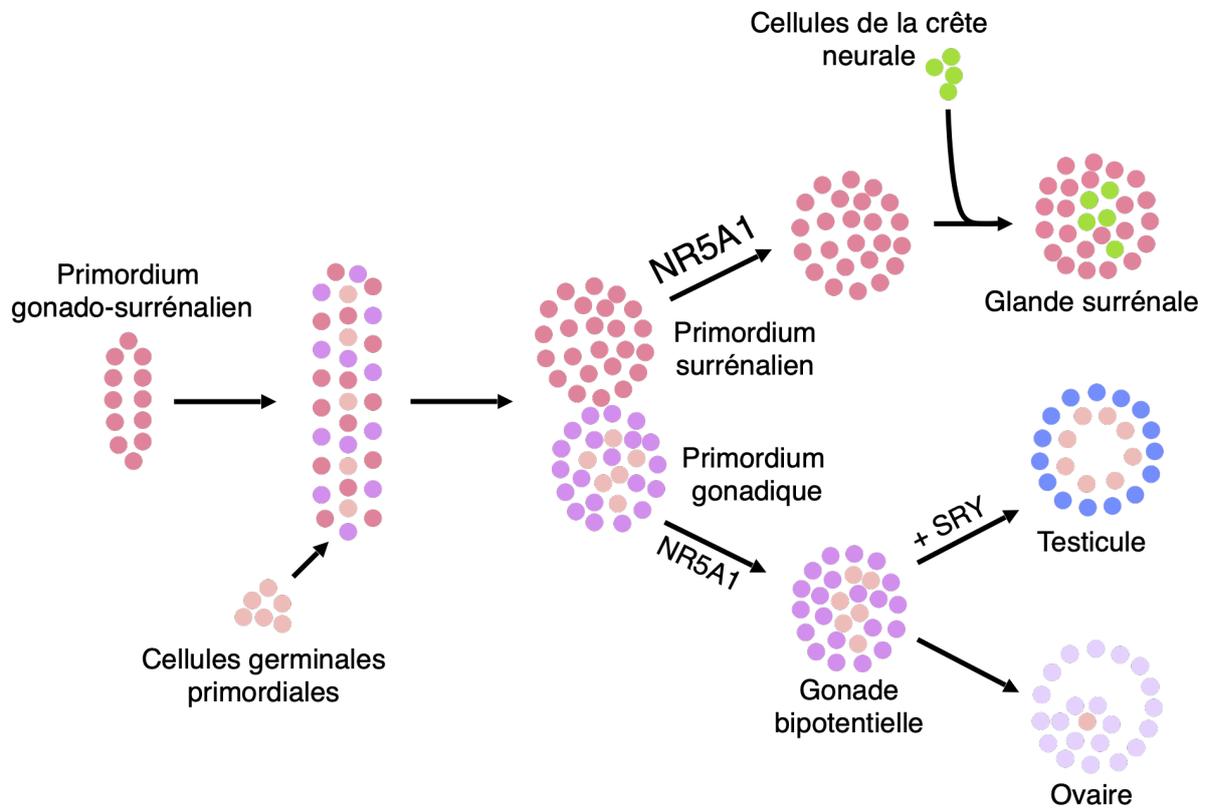


Figure 32 : Du primordium gonado-surrénalien aux glandes surrénales et aux gonades matures

Le primordium gonado-surrénalien se divise en deux parties juste après la colonisation des cellules germinales primordiales. Les cellules exprimant fortement *Nr5a1* donneront naissance au primordium surrenalien alors que les cellules exprimant faiblement *Nr5a1* donneront naissance au primordium gonadique. Le primordium surrenalien sera ensuite colonisé par les cellules de la crête neurale et les gonades se différencieront en ovaire ou en testicule selon le sexe chromosomique de l'individu.

Adapté de (Morohashi, 1997)

développement embryonnaire, le primordium gonado-surrénalien se divise en deux parties qui donneront naissance au primordium surrénalien et au primordium gonadique (Vidal and Schedl, 2000). Ce mécanisme est dépendant du niveau d'expression de *Nr5a1* (voir Chapitre I.1. La formation des crêtes génitales (de la gonade bipotentielle)). En effet, à 10,50jpc les cellules exprimant fortement *Nr5a1* constitueront le primordium surrénalien alors que les cellules exprimant faiblement *Nr5a1* donneront le primordium gonadique (Luo et al., 1994 ; Morohashi, 1997) (Figure 32). Une invalidation totale de *Nr5a1* provoque une agénésie des glandes surrénales et une absence de gonades à la naissance (Luo et al., 1994). Par contre, l'invalidation d'une copie de *Nr5a1* induit une diminution de la taille des glandes surrénales ce qui illustre l'action dose-dépendante de NR5A1 dans la formation des organes stéroïdogènes (Bland et al., 2000 ; Bland et al., 2004). Le rôle de *Nr5a1* durant le développement embryonnaire du testicule plus particulièrement dans les cellules de Sertoli et de Leydig a été développé dans le chapitre précédent (Chapitre I, 2.1.A. Les cellules de Sertoli et B. Les cellules de Leydig fœtales / adultes).

La stéroïdogénèse fait intervenir des protéines de la famille des cytochromes P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases (Figure 21). NR5A1 est impliqué dans la stéroïdogénèse en régulant l'expression des gènes indispensables à ce processus à plusieurs niveaux.

L'un des premiers facteurs régulant la stéroïdogénèse est l'homéostasie du cholestérol, c'est-à-dire sa disponibilité et donc son transport à travers la circulation générale et dans les cellules. D'abord, lorsque le cholestérol est libre dans la circulation, ce dernier est estérifié par une protéine appelée SOAT1 (sterol o-acyltransferase 1, aussi appelé ACAT) (Ferraz-De-Souza et al., 2011 ; Rogers et al., 2015). Puis, pour être distribué aux cellules, le cholestérol doit retrouver une forme non estérifiée grâce à HSL (lipase/cholesteryl esterase codé par *Lipe* pour lipase, hormone sensitive) (Hołysz et al., 2011 ; Kulcenty et al., 2015). Son entrée dans les cellules se fait via le récepteur SCARB1 (scavenger receptor class B, member 1) (Cao et al., 1997). Enfin, le transport du cholestérol dans la cellule et son entrée dans les mitochondries où a lieu la stéroïdogénèse sont possibles grâce aux protéines STAR (steroidogenic acute regulatory protein) et SCP2 (sterol carrier protein-2) (Lopez et al., 2001 ; Mizutani et al., 2010 ; Hatano et al., 2016). L'expression des gènes codants pour SOAT1, HSL, SCARB1, SCP2 et STAR est régulée par NR5A1.

Une fois que le cholestérol se trouve dans les mitochondries, il subit de nombreuses étapes de transformations catalysées par des protéines de la famille des cytochromes P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases. Les gènes codants pour un grand nombre d'entre elles

Gène stéroïdogène	Localisations principales	Références
<i>STAR</i>	Cellules de la thèque, cellules de granulosa, en phase lutéal, cellules de Leydig	Carlberg et al., 2010 ; Christenson et al., 2003 ; Hatano et al., 2016 ; Jeyasuria et al., 2004 ; Parker et al., 2002
<i>CYP11A1</i>	Cellules de la thèque, cellules de granulosa, en phase lutéal, cellules de Leydig	Buaas et al., 2012 ; Clemens et al., 1994 ; Hatano et al., 2016 ; Jeyasuria et al., 2004 ; Parker et al., 2002 ; Shih et al., 2011 ; Shih et al., 2008 ; Wakimoto et al., 1984
<i>CYP17A1</i>	Cellules de la thèque, cellules de granulosa, en phase lutéal, cellules de Leydig	Buaas et al., 2012 ; Park et al., 2010 ; Parker et al., 2002
<i>CYP19</i>	Cellules de granulosa, cellules de Leydig, cellules de Sertoli	Lynch et al., 1993 ; Miyabayashi et al., 2015 ; Wang et al., 2017
<i>HSD17B1</i>	Tissus endométriosiques	Attar et al., 2009
<i>HSD3B1</i>	Cellules de la thèque, cellules de Leydig	Buaas et al., 2012 ; Miyabayashi et al., 2015
<i>HSD3B2</i>	En phase lutéal, cellules de Leydig	Martin et al., 2005 ; Val et al., 2003

Table 4 : Localisations principales dans les organes reproducteurs des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse et régulés par *NR5A1*

Adapté de (Meinsohn et al., 2019)

possèdent des sites consensus de fixation de NR5A1 (Parker and Schimmer, 1997 ; Miller and Auchus, 2011) (**Table 4**). Malgré l'importance de NR5A1 dans la stéroïdogénèse et la formation des glandes surrénales, peu de cas de patients atteints d'insuffisance surrénalienne présentant des mutations dans le gène *NR5A1* ont été répertoriés à ce jour. Ainsi, il semble que chez l'homme la fonction surrénalienne soit moins sensible à la perte de l'activité de NR5A1 que la fonction gonadique (Buonocore and Achermann, 2020).

B. L'ovaire

Nr5a1 est exprimé dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle puis n'est plus détecté dans l'ovaire entre 13,50jpc et la naissance (Ikeda et al., 1994). Plus tard, *Nr5a1* est exprimé dans les cellules de granulosa et dans les cellules de la thèque (Hinshelwood et al., 2003). L'inactivation conditionnelle de *Nr5a1* dans les cellules de granulosa chez la souris grâce à la recombinaison Cre provoque la stérilité des animaux par hypoplasie des ovaires, diminution du nombre d'ovocytes et absence de corps jaune. De plus, les cellules de granulosa présentent une baisse d'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et une baisse d'expression d'*Amh* (Pelusi et al., 2008). Chez la femelle *Amh* est impliquée dans la folliculogénèse. La diminution du taux d'AMH est en adéquation avec le fait que chez l'homme, NR5A1 agit en coopération avec FOXL2 pour induire l'expression d'*Amh* (Jin et al., 2016).

C. Développement neuronal

Chez la souris aux stades embryonnaires, *Nr5a1* est exprimé dans le prosencéphale à partir de 11,50jpc et dans le diencéphale à partir de 12,50jpc (Ikeda et al., 1994). A l'âge adulte, *Nr5a1* est exprimé dans les cellules du noyau ventro-médian de l'hypothalamus et ses précurseurs (Ikeda et al., 1995 ; Stallings et al., 2002). Son inactivation totale ou spécifiquement dans le noyau ventro-médian de l'hypothalamus provoque une désorganisation importante de l'architecture de ce dernier, et des défauts de différenciation des neurones qui le composent. On observe aussi une diminution de l'activité locomotrice qui provoque une obésité tardive chez les animaux invalidés (Ikeda et al., 1995 ; Dellovade et al., 2000 ; Majdic et al., 2002 ; Tran et al., 2003 ; Kim et al., 2011). Chez la femelle, le noyau ventro-médian de l'hypothalamus régule un certain nombre de processus reproductif et notamment le comportement sexuel et le cycle

ovarien. L'invalidation de *Nr5a1* dans le système nerveux central provoque des cycles ovariens irréguliers conduisant à une hypofertilité et un comportement sexuel anormal. En effet, les femelles invalidées présentent une baisse de réceptivité en présence de mâles, et une diminution de la lordose qui est le réflexe de courbure du dos permettant la pénétration vaginale (Kim et al., 2010). Ces données montrent que l'implication de *Nr5a1* dans le noyau ventro-médian de l'hypothalamus est importante pour l'homéostasie énergétique, mais aussi le comportement sexuel chez la souris.

D. L'endométriose

L'endométriose est une maladie qui touche 6% à 10% des femmes en âge de procréer et qui se manifeste par la présence de glandes endométriales et de stroma à des emplacements ectopiques, majoritairement dans le péritoine, les ovaires et le septum recto-vaginal (structure qui sépare le vagin et le rectum). Dans les tissus endométriaux on constate une augmentation de l'expression des gènes *STAR* et *NR5A1*, qui est corrélée avec la gravité de l'affection chez les patientes (prostaglandin-endoperoxy synthase 2)(Tian et al., 2009 ; Burney and Giudice, 2012 ; Anupa et al., 2019). L'augmentation de l'expression de *NR5A1* est causée par une hypométhylation de son promoteur et son exon 1, et un enrichissement de l'acétylation des histones 3 et 4 au niveau de son promoteur (Xue et al., 2007 ; Yamagata et al., 2014 ; Monteiro et al., 2014 ; Houshdaran et al., 2016). La réexpression de *NR5A1* dans les tissus endométriaux contribuerait à leur croissance en provoquant l'augmentation de la stéroïdogénèse locale et en favorisant l'inflammation (Xue et al., 2007 ; Vasquez et al., 2016).

E. Cancer

La dérégulation de l'expression de *NR5A1* a été observée dans de nombreux cancers. Premièrement, dans certains cancers de l'ovaire on constate une diminution de l'expression de *NR5A1* (Hu et al., 2015 ; Hattori et al., 2015). En effet, *NR5A1* jouerait un rôle de suppresseur de tumeur en favorisant la synthèse de progestérone qui, elle-même, induirait une baisse de la prolifération tumorale et une augmentation de l'apoptose des cellules (Syed et al., 2001 ; Lukanova and Kaaks, 2005 ; Hinkula et al., 2006 ; Ramayya et al., 2010).

Deuxièmement, dans le cadre des tumeurs surrenaliennes on observe, à l'inverse, une augmentation de l'expression de *NR5A1*. Chez les enfants atteints de tumeurs surrenaliennes,

on constate une augmentation du nombre de copies de *NR5A1* (Figueiredo et al., 2005). Cette augmentation, provoque une augmentation de l'expression de *NR5A1* qui induit une dérégulation des gènes impliqués dans le métabolisme des stéroïdes, le cycle cellulaire, l'apoptose et l'adhésion à la matrice extracellulaire (Doghman et al., 2007). Ces dérégulations, aussi observées dans des modèles murins, conduisent à une prolifération incontrôlée des cellules des glandes surrénales et l'apparition de tumeur (Doghman et al., 2007). L'action de la sphingosine un antagoniste naturel de NR5A1 (voir Chapitre III. 2.2 Ligands hypothétiques), n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules des glandes surrénales ni sur l'expression des gènes cibles de NR5A1. Ce résultat suggère que l'action de NR5A1 dans les tumeurs surrénales est indépendante de la fixation des phospholipides (Doghman et al., 2007). Par contre, l'équipe de Enzo Lalli a montré que des traitements avec un agoniste inverse, l'isoquinolinone, permettent de diminuer la prolifération des cellules tumorales ; cette molécule pourrait ainsi servir à améliorer les chimiothérapies des cancers surrénaux (Doghman et al., 2009). Enfin, les cancers testiculaires causés par des tumeurs des cellules de Leydig sont rares. Néanmoins, dans ce type de tumeurs, on observe aussi une augmentation de l'expression de NR5A1 conduisant à des niveaux élevés d'œstradiol chez l'homme et le rat (Sirianni et al., 2007 ; Straume et al., 2012). Bien que l'implication de *NR5A1* dans ces types de cancers ait été démontrée, il reste à comprendre comment ce dernier agit pour provoquer la prolifération aberrante des cellules tumorales. L'équipe de Bon-chu Chung a montré que NR5A1 est impliqué dans l'homéostasie des centrosomes dans les cellules surrénales et les cellules de Leydig. D'ailleurs, dans les cellules des tumeurs surrénales il a été observé des défauts du nombre de centrosomes (Roshani et al., 2002). Ainsi, il a été proposé que NR5A1 agit comme un gardien en prévenant la duplication excessive des centrosomes et donc la prolifération aberrante des cellules (Wang et al., 2013a ; Wang et al., 2013b ; Wang et al., 2014).

F. Troubles du développement sexuel

Les troubles du développement sexuel (TDS), appelés DSD en anglais pour « disorders/differences of sex development » désignent les affections congénitales dans lesquelles le développement du sexe chromosomique, gonadique ou anatomique est atypique (Hughes et al., 2006). A ce jour 188 mutations dans le gène *NR5A1* ont été recensées et 238 cas de patients porteurs de ces mutations ont été publiés (Fabbri-Scallet et al., 2020). En 2020, Maricilda Palandi de Mello et son équipe ont publié un article dans lequel ils réexaminent

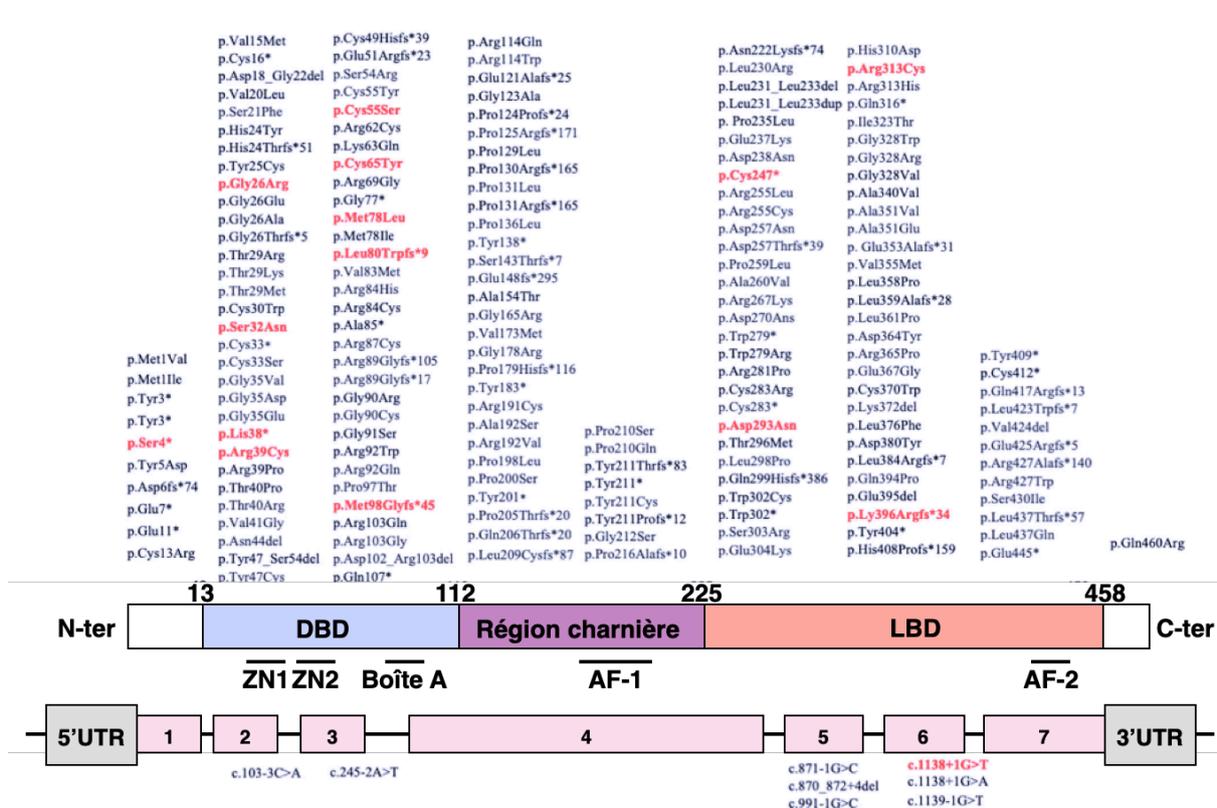


Figure 33 : Localisations des 188 mutations du gène NR5A1 chez l'homme

La partie inférieure représente les 7 exons qui composent la séquence génomique de NR5A1. Les mutations indiquées en dessous de cette séquence correspondent aux mutations introniques.

La partie supérieure représente la protéine NR5A1 avec ses différents domaines. ZN1 et ZN2 désignent les deux doigts de zinc présents dans le domaine de liaison à l'ADN (DBD). AF-1 et AF-2 désignent les domaines d'activation donc le second est présent dans le domaine de liaison au ligand (LBD). Les mutations indiquées au-dessus de cette séquence correspondent aux mutations localisées dans les exons et sont écrites de manière à traduire les changements d'acides aminés qu'elles provoquent sur la séquence protéique.

Adapté de (Fabbri-Scallet et al., 2020)

l'ensemble de ces cas, dans le but d'identifier des liens entre le génotype et le phénotype de ces patients (Fabbri-Scallet et al., 2020). Les phénotypes causés par ces mutations sont très variés ; on retrouve par exemple des dysgénésies gonadiques complètes ou partielles, de l'infertilité, une insuffisance ovarienne, la présence d'ovaires polykystiques, la présence d'ovotesticule ou encore la persistance des dérivés des canaux de Müller chez des patients 46XY (Bashamboo et al., 2016 ; Igarashi et al., 2017 ; Fabbri-Scallet et al., 2020)(Table 4). Les auteurs ont aussi constaté que 90% des patients affectés par une mutation dans le gène *NR5A1* présentent un caryotype 46XY et seulement 54% d'entre eux ont une apparence masculine contre 46% avec une apparence féminine (Malikova et al., 2014). Pour les 10% des patients 46XX, on observe que 25% d'entre eux présentent une absence des dérivés des canaux de Müller et la moitié de ces derniers ont une apparence masculine (Bashamboo et al., 2016 ; Igarashi et al., 2017). Ces mutations sont localisées dans des régions très différentes sur le gène *NR5A1* : 35% sont situées dans le domaine de liaison à l'ADN et 42% dans le domaine de liaison du ligand. Ces données ne permettent pas de faire de corrélation entre le phénotype observé et le domaine où se situe la mutation (Figure 33). Néanmoins, même si ces troubles proviennent majoritairement d'une mutation dans le gène *NR5A1*, il a aussi été vu que des duplications ou des délétions de portion du chromosome 9 sur lequel se situe *NR5A1* peuvent causer des TDS (Barbaro et al., 2007 ; Schlaubitz et al., 2007 ; van Silfhout et al., 2009 ; Harrison et al., 2013). Ces données permettent de confirmer que *NR5A1* agit de manière dose-dépendante. Enfin, en prenant en compte les différents phénotypes allant d'une apparence féminine ou masculine complète et les différentes mutations, les auteurs n'ont pas réussi à faire de corrélation entre le type de mutation, leur localisation et la sévérité du phénotype de TDS qui en résulte (Fabbri-Scallet et al., 2020).

Objectifs

Objectifs

Comme il a été décrit dans l'introduction, la formation du testicule à partir du primordium gonado-surrénalien se déroule en plusieurs étapes nécessitant l'activation de plusieurs cascades d'expression de gènes. L'efficacité d'action de ces derniers dépend du moment et de la dose à laquelle ils sont exprimés. L'un de ces gènes clés du développement testiculaire est *Nr5a1*. Dans un premier temps, la division du primordium gonado-surrénalien en primordium surrénalien et en primordium gonadique est dépendante du niveau d'expression de *Nr5a1* (Luo et al., 1994). Dans un second temps, il a été découvert que son niveau d'expression est déterminant lors de la différenciation des cellules somatiques en cellules stéroïdogènes. Puis, en coopération avec SRY, NR5A1 permet l'initiation de l'expression de *Sox9*, un gène essentiel à la différenciation sexuelle et la différenciation des cellules de Sertoli. Une fois la différenciation sexuelle achevée, *Nr5a1* est fortement exprimé dans les cellules de Leydig. Aussi, c'est son rôle comme facteur de transcription régulant les gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, dans les cellules de Leydig, qui a été le plus étudié (Morohashi et al., 1992 ; Morohashi and Omura, 1996).

Plusieurs études génétiques chez la souris ont aussi permis d'appréhender le rôle de *Nr5a1* avant la différenciation sexuelle. En effet, les modèles dans lesquels *Nr5a1* est surexprimé lors de l'inactivation de *Pod1* et *Wt1* ont permis de mettre en lumière le rôle de *Nr5a1* dans la différenciation des précurseurs somatiques en cellules stéroïdogènes et de soutien (Cui et al., 2004 ; Chen et al., 2017). Ces modèles n'ont malheureusement pas permis d'étudier le rôle de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli après la différenciation sexuelle. Et pourtant, *Nr5a1* est exprimé dans les cellules de Sertoli tout au long de la vie. Mon projet de thèse avait justement pour objectif d'étudier le rôle de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli après la différenciation sexuelle. Pour cela, j'ai généré un modèle de souris mutantes (*Nr5a1^{SC-/-}*), dans lequel le gène codant NR5A1 est invalidé uniquement dans les cellules de Sertoli, à partir de 13,50jpc.

J'ai d'abord analysé l'impact de l'inactivation de *Nr5a1* sur l'architecture du testicule et l'expression des gènes Sertoliens car les études publiées à ce jour ont mis en évidence que NR5A1 est capable de se fixer et de réguler l'expression d'un certain nombre d'entre eux, souvent en coopération avec d'autres facteurs de transcription. Puis, je me suis attachée à comprendre le devenir des cellules germinales chez les animaux *Nr5a1^{SC-/-}* car il est établi que les cellules de Sertoli jouent un rôle déterminant dans le testicule fœtal en prévenant leur entrée

en méiose et en régulant leur entrée en quiescence. J'ai aussi étudié le devenir et l'activité des cellules de Leydig, dont on sait que la différenciation dépend en partie de signaux provenant des cellules de Sertoli. Par la suite, j'ai analysé la formation du tractus urogénital des animaux mutants. La différenciation des organes sexuels peut dépendre des niveaux d'AMH, de testostérone et de dihydrotestostérone produites à des stades différents et par différents types cellulaires. J'ai aussi analysé au niveau moléculaire l'effet de l'inactivation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli. Pour cela j'ai déterminé le transcriptome de chaque cellule qui compose le testicule, 24 heures après l'inactivation de *Nr5a1*. Cette méthode permet d'observer les variations fines d'expression des gènes dans tous les types cellulaires présents dans la gonade.

Enfin, je me suis demandé si l'inactivation de *Nr5a1* des cellules de Sertoli une fois que celles-ci soient devenues post-mitotique (environ 15 jours après la naissance) avait un impact sur leur fonction lors de la spermatogénèse. Pour cela, j'ai généré un autre modèle de souris mutantes, dans lequel *Nr5a1* est invalidé dans les cellules de Sertoli après la naissance, grâce à un système génétique inductible permettant de contrôler le moment exact de l'inactivation.

Les résultats de ces travaux font l'objet d'une publication qui sera prochainement proposée à un journal scientifique. Ils se trouvent dans la section suivante.

Chapitre IV

Résultats

NR5A1 is required in Sertoli cells after sex determination to maintain both cellular identity and survival during fetal development

Sirine SOUALI-CRESPO¹, Diana CONDREA¹, Nadège VERNET¹, Betty FÉRET¹, Muriel KLOPFENSTEIN¹, Erwan GRANDGIRARD^{1,2}, Marie CERCIAT^{1,3}, Matthieu JUNG^{1,3}, Manuel MARK^{1,4}, and Norbert B. GHYSELINCK^{1*}

1. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Département de Génétique Fonctionnelle et Cancer, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR7104), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U1258), Université de Strasbourg (UNISTRA), 1 rue Laurent Fries, BP-10142, F-67404 Illkirch Cedex, France
2. GenomEast Platform, France Génomique consortium, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch Cedex, France
3. Imaging Center, IGBMC, F-67404 Illkirch Cedex, France
4. Service de Biologie de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), France

Nr5a1 is an orphan nuclear receptor crucial for gonadal development in mammals. It is expressed in the somatic cells of the gonad, throughout the sex determination period, during which it controls genes involved in differentiation of Sertoli and Leydig cells (SC and LC, respectively). To investigate its role at later stages, we have generated and analysed mutant mice lacking *Nr5a1* in SC (*Nr5a1*^{SC-/-}), from embryonic day 13.5 (E13.5) onwards. The loss of *Nr5a1* first induces a decreased expression of characteristic genes of the SC identity (e.g., *Sox9*, *Sox8*, *Amh*). It also induces a disorganization of the seminiferous cords, which yields male germ cells to prematurely enter meiotic prophase I at E14.5 instead of becoming quiescent, as observed in a normal situation. Single-cell RNA-sequencing experiments revealed that some *Nr5a1*-deficient SC express genes found in somatic progenitor cells from earlier stages, while some other express genes characteristic of the granulosa cell identity. This finding indicates that loss of *Nr5a1* induces dedifferentiation of SC, as well as their *trans*-differentiation into female somatic cells. Cell-fate mapping also shows that *Nr5a1*-deficient SC progressively die by a *Trp53*-independent mechanism related to anoikis. As a consequence, *Nr5a1*^{SC-/-} newborn testes contain only LC and interstitial cells. Adult mutants display Müllerian duct derivatives (i.e., uterus, vagina) that can be explained by loss of *Amh* expression in SC. They also display a decreased anogenital distance, and smaller seminal vesicles and penis, likely related to the loss of *Hsd17b1*- and *Hsd17b3*-mediated synthesis of testosterone in SC. Altogether our results reveal that *Nr5a1* safeguards the identity of SC and prevents their death during testicular development at stages later than the period of sex determination.

RESULTS

Deletion of Nr5a1 in Sertoli cells.

To achieve *Nr5a1* ablation in Sertoli cells (SC) later than at the stage of sex determination, we introduced the Sertoli-cell expressed *Plekha5*^{Tg(AMH-cre)1Flor} transgene (Lécureuil et al., 2002) in mice bearing *loxP*-flanked alleles (L2) of *Nr5a1*. To visualize *Nr5a1*-deleted SC, we further introduced the Cre-dependent reporter transgene *Gt(ROSA)26Sor*^{tm1(EYFP)Cos} (Srinivas et al., 2001) in our mice. The resulting *Plekha5*^{Tg(AMH-cre)1Flor}; *Nr5a1*^{+/+}; *Gt(ROSA)26Sor*^{tm1(EYFP)Cos} and *Plekha5*^{Tg(AMH-cre)1Flor}; *Nr5a1*^{L2L2}; *Gt(ROSA)26Sor*^{tm1(EYFP)Cos} males are referred to as controls and *Nr5a1*^{SC-/-} mutants, respectively. The timing and the efficiency of Cre-mediated recombination was assessed through the use of immunohistochemis-

try (IHC) with antibodies recognizing the yellow fluorescent protein (YFP). No YFP protein was detected at E11.5. Quite surprisingly, YFP was readily detected in the gonads of embryonic day (E) 12.5 control and mutant fetuses, in all SC (arrows, Fig. 1A,B). This indicates that Cre-mediated excision was efficient in our genetic background from E12.5, earlier than anticipated according to the Cre expression pattern previously described for the *Plekha5*^{Tg(AMH-cre)1Flor} transgene (Lécureuil et al., 2002). Loss of NR5A1 in SC was then assessed by IHC. The NR5A1 protein was still detected in the nuclei of many SC of mutant testes at E12.5 (Fig. 1B), at a similar level than in control testes (Fig. 1A). At E13.5, the SC were

* Author for correspondence: norbert@igbmc.fr Tel: +33 388 655 674; Fax: +33 388 653 201

readily identified by their expression of YFP (arrows, **Fig. 1C,D**). The nuclei of all of them were NR5A1-positive in the control (**Fig. 1C**), but NR5A1-negative in the mutant testes (**Fig. 1D**). Importantly, NR5A1 was prominently detected in the nuclei of other cells (arrowheads), which were assigned the identity of Leydig cells (LC) because of their co-expression of the steroid 3 beta-hydroxy-steroid dehydrogenase type 1 (HSD3B1, **Fig. 1E,F**) of both control and mutant testes, further attesting for the SC-specific excision of *Nr5a1*. Altogether these data indicate that efficient Cre-mediated recombination of the *Nr5a1* loxP-flanked alleles occurred as early as E12.5, and that NR5A1 protein was lost in SC from E13.5 onwards.

Ablation of *Nr5a1* in SC alters testis histology.

We analysed the histology of *Nr5a1*^{SC-/-} testes during fetal development. While normal at E13.5 (**Fig. 1G,H**), the majority of *Nr5a1*^{SC-/-} testis cords at E14.5 displayed reduced diameters and poorly defined and discontinuous contours (broken dotted line, **Fig. 1I,J**). At E15.5 the organisation into cords had almost disappeared, (broken dotted line, **Fig. 1K,L**). In addition, from E14.5 onwards germ cells (GC) displayed an abnormal appearance, suggesting premature entry into meiosis and/or by apoptotic death (arrows, **Fig. 1J,L**).

Ablation of *Nr5a1* in SC induces germ cells to enter meiosis prematurely.

To determine the fate of GC, we performed 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation experiments combined with IHC for detection of DDX4, a GC-specific cytoplasmic protein (Fujiwara et al., 1994). We found that the proportion of BrdU-positive GC in control testes decreased from 29 ± 6% (n=3) at E13.5 to 3 ± 2% (n=3) and 2 ± 1% (n=3) at E14.5 and E15.5, respectively (**Fig. 2A-C,G**). In contrast, 36 ± 9% (n=3), 24 ± 3% (n=4) and 26 ± 8% (n=3) of GC were in S-phase in the *Nr5a1*^{SC-/-} testes at E13.5, E14.5 and E15.5, respectively (**Fig. 2D-G**). This suggested that GC in mutant testes may enter the meiotic prophase instead of becoming quiescent as in the control situation. Accordingly, many GC present in the *Nr5a1*^{SC-/-} testes at E14.5 expressed meiotic makers (Vernet et al., 2020), such as the gatekeeper STRA8 or the cohesin REC8 (**Fig. 2M,N**). Some of them stained positively for the histone variant H2AFX (**Fig. 2O**). The same applied for the few remaining GC in E15.5 *Nr5a1*^{SC-/-} testes (**Suppl. Fig. 1**). In contrast, GC in control testes did not express any meiotic marker (**Fig. 2H-K**), as anticipated for GC entering quiescence. To further assess the fate of GC, we performed terminal deoxy-nucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL)

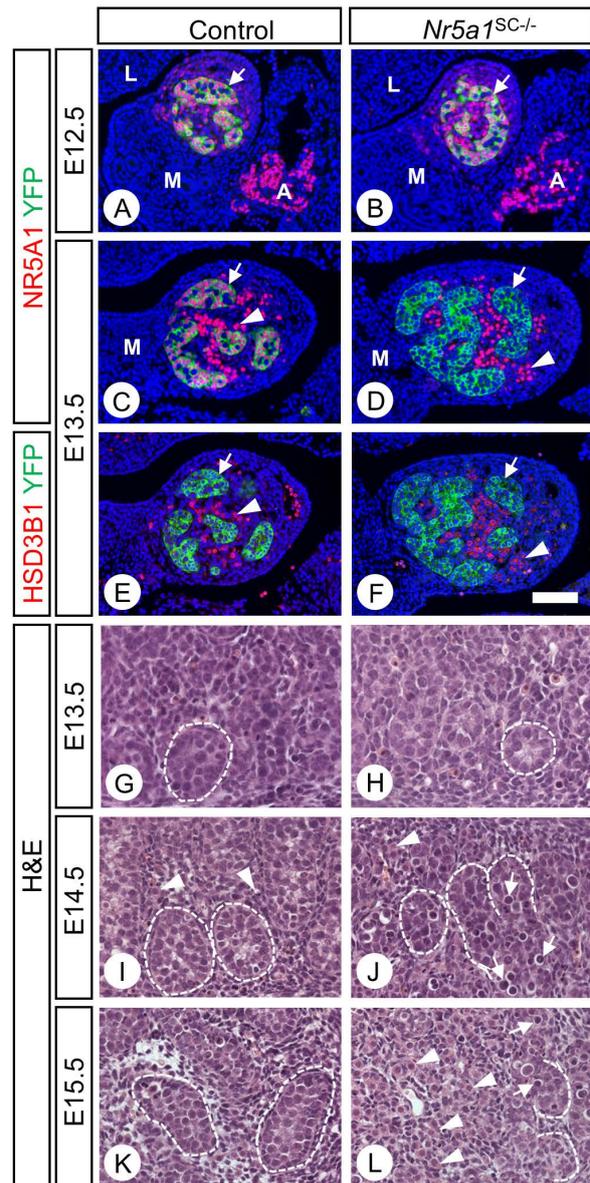


Figure 1. Ablation of *Nr5a1* is efficient from E13.5 onwards. (A-F) Detection of NR5A1 (red nuclear signals), YFP (green cytoplasmic signal), and HSD3B1 (red cytoplasmic signal) by IHC on transverse histological sections of the testis of a control (A,C,E) and a *Nr5a1*^{SC-/-} mutant foetus (B,D,F) at E12.5 (A,B) and E13.5 (C-F). Efficient excision of the reporter transgene by cre is assessed by YFP expression in virtually all Sertoli cells (arrows) as early as E12.5 (A,B). However, loss of NR5A1 in Sertoli cells is only achieved at E13.5 (compare C with D). At this stage, expression of NR5A1 is maintained in Leydig cells (arrowheads in C,D), as identified on consecutive sections by their expression of HSD3B1 (E,F). Nuclei are counterstained with DAPI (blue signal). (G-L) Histological sections through E13.5 (G,H), E14.5 (I,J) and E15.5 (K,L) control (G,I,K) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant (H,J,L) fetuses stained by hematoxylin and eosin (H&E). In controls, the seminiferous cords are well defined (dotted lines). In mutants, they are poorly defined from E14.5 onwards (broken dotted lines). Legend: A, adrenal gland; L, liver, M, mesonephros. Scale bar (in F): 60 µm (A-F) and 30 µm (G-L).

assays at E14.5. The number of TUNEL-positive cells was significantly larger in *Nr5a1*^{SC-/-} testes than in controls [79 ± 9 cell/mm² (n=6) versus 27 ± 11 cell/mm² (n=3), respectively; p<0.05].

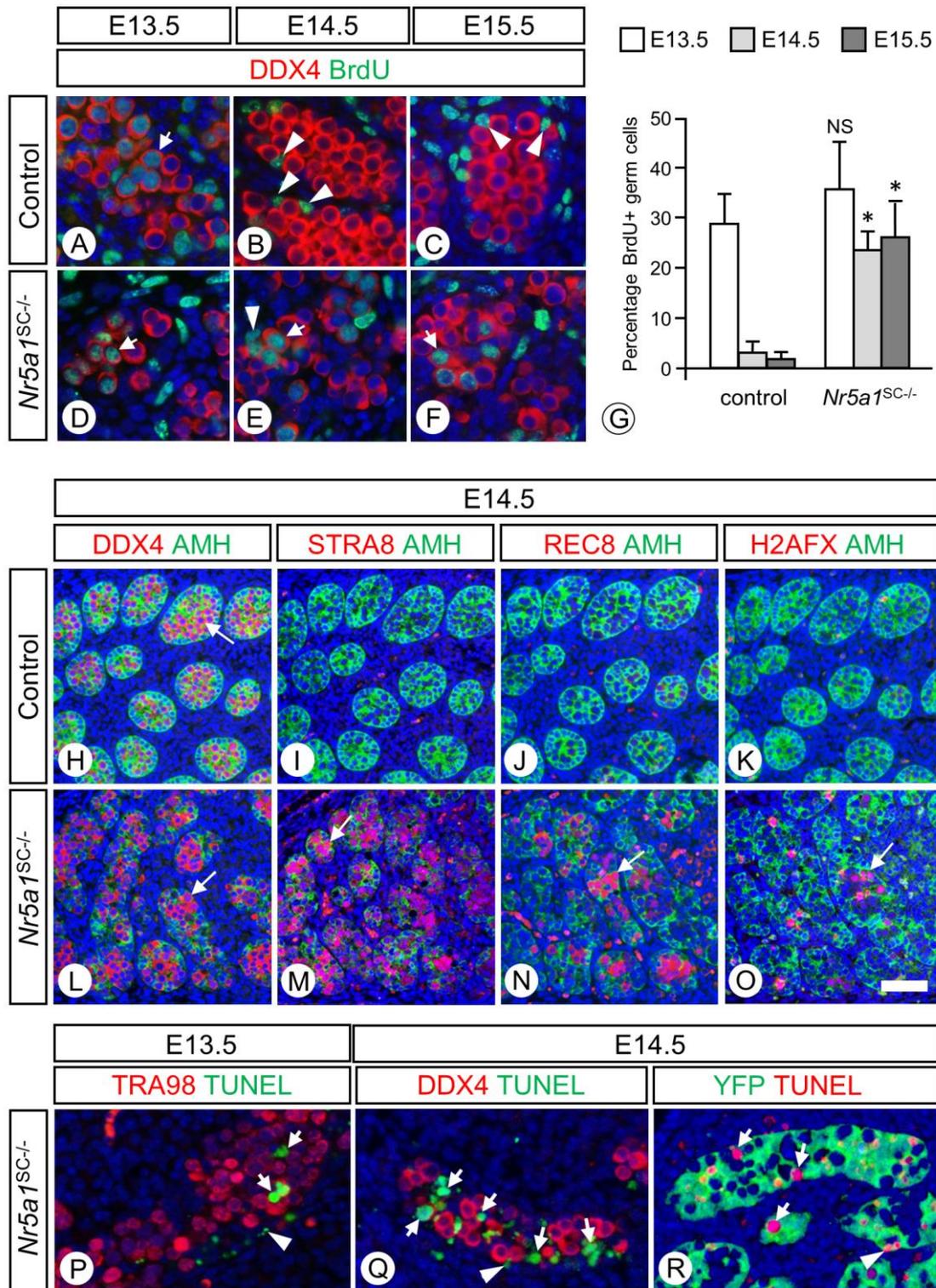


Figure 2. Germ cells prematurely initiate meiosis and die in *Nr5a1*^{SC-/-} mutants. (A-F) Detection of DDX4 (red cytoplasmic signals) and BrdU (green nuclear signals) by IHC on histological sections of control (A-C) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant (D-E) testes at E13.5 (A,D), E14.5 (B,E) and E15.5 (C,F). Arrows and arrowheads point to BrdU-positive germ and Sertoli cells, respectively. **(G)** Histograms showing the percentage of BrdU-positive germ cells in control and mutant testes, as a function of the developmental stages. **(H-O)** Detection of DDX4, STRA8, REC8, H2AFX (red signals) and AMH (green cytoplasmic signals) by IHC on histological sections of control (H-K) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant (L-O) testes at E14.5. Arrows point to germ cells. The meiotic STRA8, REC8, H2AFX proteins are detected in the mutant but not in the control testes. **(P,Q)** Detection of TUNEL-positive cells (green signals) and TRA98- or DDX4-positive germ cells (red signals) on histological sections from E13.5 (P) and E14.5 (Q) *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testes. **(R)** Detection of TUNEL-positive cells (red signal) and YFP-positive Sertoli cells (green signal) on histological sections from an E14.5 mutant testis. Arrows and arrowheads (in P-R) point to TUNEL-positive cells which are likely to be germ cells and Sertoli cells, respectively. Scale bar (in O): 25 μ m (A-F), 50 μ m (H-O) and 30 μ m (P-R).

Many of the TUNEL-positive cells in the mutants were identified as GC, because of the large size of their nuclei, and their localization inside the cords, amongst clusters of GC-specific nuclear antigen TRA98-positive/DDX4-positive cells, or surrounded by the cytoplasm of SC (Fig. 2P-R). Altogether, these findings indicate that NR5A1-deficient SC were not able to support normal differentiation of GC, which eventually died.

Ablation of *Nr5a1* in SC impairs expression of *SOX9*, *SOX8*, *SOX10* and *AMH*.

NR5A1 is known to regulate the anti-Müllerian hormone (*Amh*) gene in SC (de Santa Barbara et al., 1998). AMH protein was detected at a normal level in E12.5 *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testes (Fig. 3A,B), and its expression decreased progressively between E13.5 and E14.5 (Fig. 3C-F). Because NR5A1 interacts with SOX9 to regulate *Amh* and is required for the maintenance of SOX9 expression (de Santa Barbara et al., 1998; Sekido & Lovell-Badge, 2008), we next tested by IHC whether ablation of *Nr5a1* altered expression of SOX9. The SOX9 protein was readily detected in the nuclei of all SC in control and mutant testes at E12.5 (Fig. 3G,H). At E13.5, nuclear SOX9 was evident in all SC of the controls (Fig. 3I), but in only 50% of the SC in *Nr5a1*^{SC-/-} mutants and its expression was clearly decreased in the remaining 50% (Fig. 3J). In the E14.5 *Nr5a1*^{SC-/-} mutants, only a few SC were SOX9-positive, with a cytoplasmic staining in some of the cases (compare insets, Fig. 3K,L). To test whether the loss of NR5A1 modified the expression of other Sox genes, we checked by IHC the levels of SOX8 and SOX10, which are important for testis cord formation (Barrionuevo et al., 2009; Georg et al., 2012). SOX8 and SOX10 were not detected at E12.5 and E14.5, but many SC were SOX8- and SOX10-positive in control gonads at E13.5. In contrast, only few SC reacted positively with SOX8 or SOX10 antibodies in *Nr5a1*^{SC-/-} mutant gonads at E13.5 (Suppl. Fig. 2).

These IHC data were strengthened by the decreased steady state levels of *Amh*, *Sox9* and *Sox8* mRNAs that was evidenced by RT-qPCR analysis of whole gonads of *Nr5a1*^{SC-/-} mutants (Fig. 3S). Interestingly, the level of prostaglandin D2 synthase (*Ptgds*) mRNA was also significantly reduced in *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testes at E14.5. This finding is in keeping with the fact that SOX9 is required for normal expression of *Ptgds* (Wilhelm et al., 2007). Furthermore, it may explain the cytoplasmic localization of SOX9 observed at E14.5 in *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testes (inset, Fig. 3L) because prostaglandin D2, the end product synthesized by PTGDS, is required for nuclear translocation of SOX9 (Moniot et al., 2009).

In parallel, we analysed the expression of GATA4, a transcription factor whose expression is also important for *Amh* expression (Tremblay & Viger, 1999), and Wilm's tumor 1 protein (WT1), which is required for SC differentiation (Buganim et al., 2012). GATA4 and WT1 were detected at similar levels in SC nuclei of both control and mutant testes, from E12.5 to E14.5 (Fig. 3M-R; Suppl. Fig. 2).

Ablation of *Nr5a1* in SC induces disorganisation of the testis cords.

Expression of SOX proteins is normally required to maintain testis cord integrity (Georg et al., 2012), and SOX9 is known to regulate the expression of collagen type IV, a major component of basement membranes (Sumi et al., 2007). Given the discontinuity in the contours of testis cords (Fig. 1J,L) and the loss of SOX9 expression (Fig. 3J,L) in *Nr5a1*^{SC-/-} testes, we performed IHC for detection of collagen type IV (COL-IV). In these experiments, we took advantage of expression of the reporter transgene YFP to visualise the NR5A1-deficient SC and the contours of the testis cords. At E14.5, COL-IV was surrounding the whole periphery of some cords (Fig. 4A,B). However, its expression was absent at the periphery of some other cords in *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testes (arrows, Fig. 4B). The areas where COL-IV staining was lost corresponded to the periphery of the seminiferous cords where expression of SOX9 was also lost (arrowheads, Fig. 4D). This result suggests that loss of NR5A1 in SC yielded loss of the basement membranes of some seminiferous cords and, thereby, their disorganization.

Transcriptomic signatures of the cell-types present in control and *Nr5a1*-deficient gonads.

To assess the fate of NR5A1-deficient SC, we performed single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) experiments using dissociated cell suspensions obtained from 12 control and 16 *Nr5a1*^{SC-/-} E14.5 whole testes. All samples were processed in parallel to exclude batch effects. From a total of 5,421 and 6,444 individual transcriptomes obtained from control and mutant testicular cells, 3,675 and 4,466 cells passed standard quality control and were retained for subsequent analysis. On average, we detected 10,806 unique molecular indices (UMIs) and 3,307 genes in each individual cell, which were sufficient to define distinct cell types in the gonads. Unsupervised clustering of the total 8,141 testicular cells projected onto *t*-distributed stochastic neighbour embedding (*t*-SNE) analysis plot identified seven clusters of cells with similar transcriptomes (Fig. 5A). Only one cluster (C7) consisted of cells derived solely from *Nr5a1*^{SC-/-}

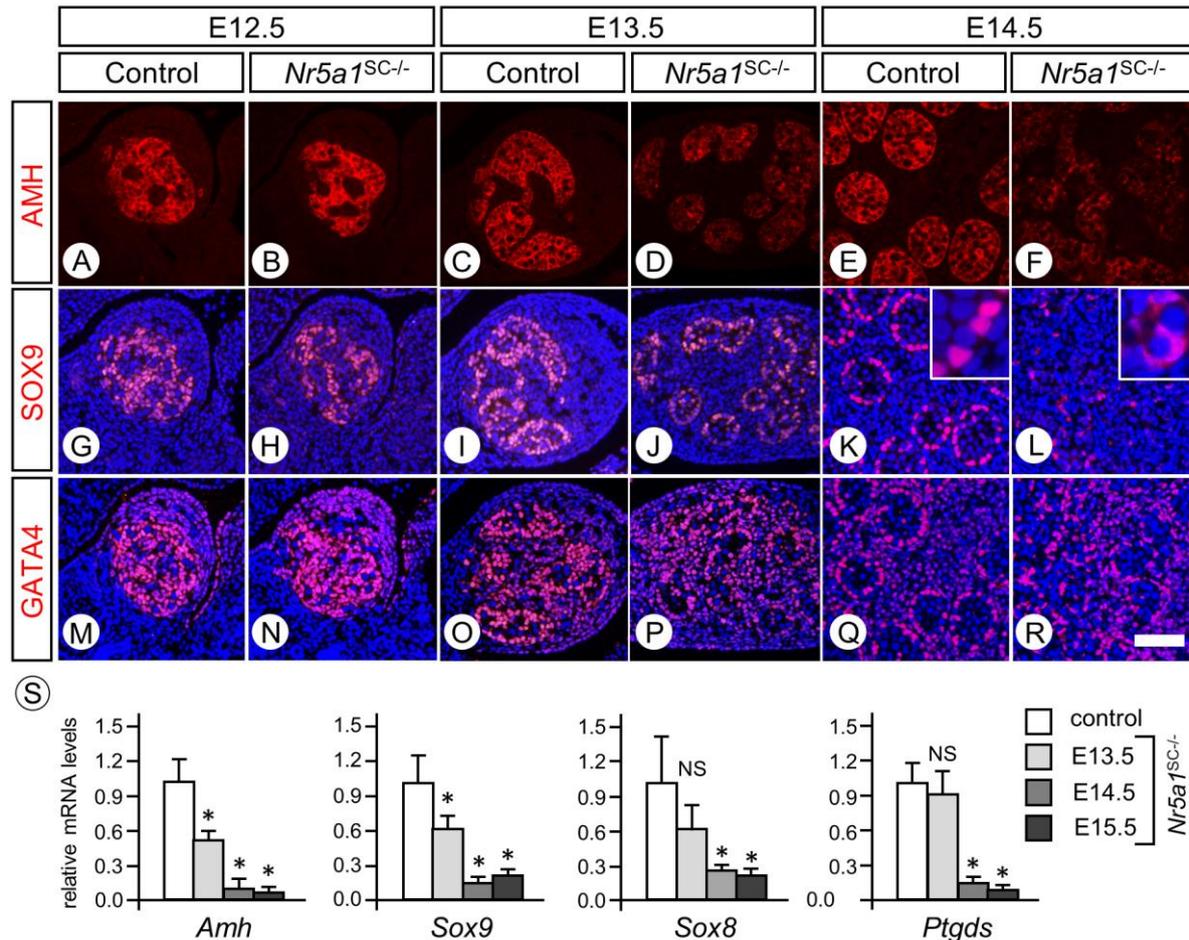


Figure 3. Ablation of *Nr5a1* in Sertoli cells impairs AMH and SOX9 expression. (A-R) Detection of AMH, SOX9 and GATA4 (red signals) on transverse histological sections of testes of control (A,C,E,G,I,K,M,O;Q) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant fetuses (B,D,F,H,J,L,N,P,R) at E12.5 (A,B,G,H,M,N), E13.5 (C,D,I,J,O,P) and E14.5 (E,F,K,L,Q,R). In (G-R) nuclei are counterstained with DAPI (blue signal). Insets (in K,L) are high magnifications showing nuclear localisation of SOX9 in control Sertoli cells versus cytoplasmic localisation in mutant Sertoli cells. Note that at each developmental stage, AMH, SOX9 and GATA4 IHC are performed on consecutive sections. (S) RT-qPCR analyses comparing the expression levels of *Amh*, *Sox9*, *Sox8* and *Ptgd5* mRNAs in whole testis RNA from control (n=5) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant (n=5) fetuses at E13.5, E14.5 and E15.5. The asterisks point to a significant difference (p < 0.05). NS, the difference is not significant. Scale bar (in R): 50 μ m (A-R).

mutant gonads. Cell-type specific (signature) transcripts were used to identify the type of cells present in each cluster. C1 is composed of cells expressing endothelial cell-markers genes *Tie* (Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1), *Esam* (Endothelial cell adhesion molecule), and *Cdh5* (Cadherin 5); C2 contains cells expressing macrophage-specific genes *Cd52* (CD52 antigen), *Cd68* (CD68 antigen), and *Lyz2* (Lysozyme 2); C3 is composed of GC, which expressed *Ddx4*, *Dazl* (Deleted in azoospermia-like) and *Mael* (Maelstrom spermatogenic transposon silencer); C4 is composed of cells expressing genes characteristics of foetal LC *Ins13* (Insulin-like 3), *Star* (Steroidogenic acute regulatory protein) and *Hsd3b1*; C5 contains cells expressing interstitial gene markers *Pdgfra* (platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide) and *Lhx9* (LIM homeobox protein 9), as well as peritubular myoid cell (PTM) expressing

Tagln (transgelin, also called SM22a); C6 is composed of control cells expressing Sertoli cell-specific genes *Amh* and *Sox9*; finally C7 is composed of the NR5A1-deficient Sertoli cells expressing *Yfp* (Suppl. Fig. 3). The number of cells identified for each cluster is indicated (Fig. 5A). No significant change of gene expression was observed for macrophages and endothelial cells isolated from control and *Nr5a1*^{SC-/-} testes. The expression of *Smoc2*, *Spats2l*, *Htra3* and *Gem* was lower in LC, while only that of *Ptch1* was reduced in interstitial and PTM cells isolated from the *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testis (Table S1). In C3, the expression of 98 genes was significantly (p < 0.05) 1.2-fold deregulated between GC isolated from control and *Nr5a1*^{SC-/-} testes (Table S2), amongst which *Stra8*, *Rec8*, *Id1* and *Smc1b* were up, and *Nanos2*, *Piwil4* and *Gdpd3* were down (Fig. 5B). Gene ontology (GO) terms analysis identified

meiotic processes (condensation of chromosomes, DNA methylation, repair and double-strand break processing, oogenesis, meiotic cell cycle and quiescence amongst the most deregulated functions (Table S2). These findings are in agreement with the IHC experiments described above, showing that GC entered meiosis in the *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testis, instead of becoming mitotically quiescent as in the control testis.

The t-SNE plot identified two sub-populations of SC in control testes (grey clusters C6a and C6b). GO terms analysis of the mRNAs they differentially expressed assigned up-regulated genes to mitosis, cell-cycle related processes and cytoskeleton organization, while down-regulated genes were assigned to mitochondrial respiration, cell-cell junction, cell-substrate adhesion, cell polarization, as well as extracellular matrix and integrin interactions. Because mitochondrial activity has to remain depressed for cell proliferation (Antico Arciuch et al., 2012) and mitotic progression is orchestrated by changes involving coordinated activities of cell junctions, cytoskeleton, membrane and the extracellular matrix (Osswald & Morais-de-Sá, 2019), we deduced that sub-population C6a corresponded to mitotic SC (Table S3; Suppl. Fig. 4).

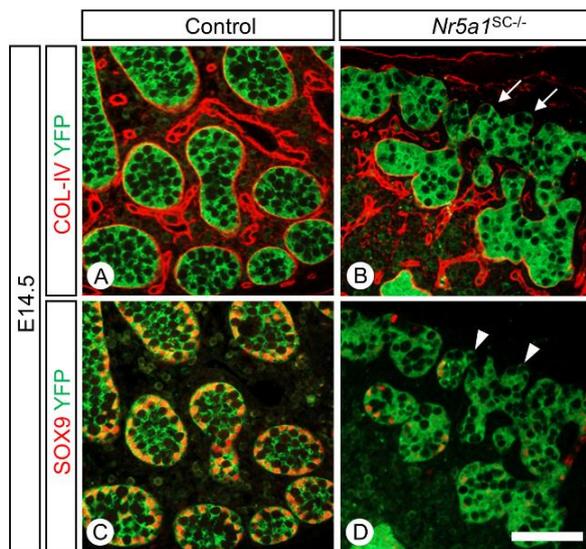


Figure 4. Loss of NR5A1 in Sertoli induces disorganisation of the testis cords. (A-D) Detection of COL-IV, SOX9 (red signals), and YFP (green signals) on transverse histological sections of the testis of control (A,C) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant fetuses (B,D) at E14.5. Note that (A,C) and (B,D) are consecutive sections. Arrows (in B) point to the loss of COL-IV at the basement membrane of seminiferous cords where SOX9 is lost in Sertoli cells (arrowheads in D). Scale bar (in D): 50 μ m (A-D).

We then compared the transcriptome profiles of control SC in cluster C6b and NR5A1-deficient SC in cluster C7. This identified 398 differentially expressed genes (1.2 fold-change, $p < 0.05$, Fig. 5C, Table S4). Amongst the 167 up-regulated

and the 231 down-regulated genes we confirmed deregulated expression of ALDH1A1, TMEM184A, PCP4 and TUBB3 by IHC (Fig. 5D-L) and of *Col6a6*, *Cyp26b1*, *Dhh*, *Fst*, *Hsd17b3*, *Inhbb*, *Itga6* and *Pcp4* by RT-qPCR experiments (Fig. 5N), validating thereby the scRNA-seq experiment. As expected, GO term analysis identified sex differentiation, gonad development and development of primary sexual characteristics amongst the top deregulated functions (Table 1).

Nr5a1-deficient SC change their molecular identity.

The set of genes differentially expressed by the SC in the *Nr5a1*^{SC-/-} mutants was compared to the sets that normally characterise the foetal SC (478 genes), the pre-SC (321 genes), the NR5A1-positive, early, somatic, progenitor cells (349 genes), the interstitial, multipotent, steroidogenic, progenitor cells (457 genes) (Stévant et al., 2018), as well as the foetal granulosa cells (428 genes; Stévant et al., 2019) (orange circles, Fig. 6A). Amongst the 231 genes which were down-regulated in NR5A1-deficient SC (grey circles, Fig. 6A), 107 of them (46%) overlapped with the set for foetal SC. Only 5 of them (2%) overlapped with the set for foetal granulosa cells, while 23 (10%), 1 (~0%) and 5 (2%) overlapped with the sets characterizing pre-SC, early and interstitial progenitor cells, respectively. On the opposite, amongst the 167 genes which were up-regulated in NR5A1-deficient SC (green circles, Fig. 6A), only 4 (2%) and 12 (7%) of them overlapped with the sets of genes characterizing SC and pre-SC, respectively (Fig. 6A). This indicated that NR5A1-deficient SC lost their identity and part of their functioning. Accordingly, the expression of crucial SC genes such as *Dmrt1*, *Dhh*, and *Hsd17b1* was dramatically decreased in mutant SC of cluster C7 (Suppl. Fig. 5). Surprisingly, 30 (18%) and 33 (20%) genes up-regulated in NR5A1-deficient SC overlapped with the sets for early somatic (e.g., *Nr2f2*, *Foxc1*, *Igf1bp5*, *Sfrp1*) and interstitial progenitors (e.g., *Nr2f2*, *Vcan*, *Ssbp2*), respectively. In addition, 25 genes (15%) overlapped with the set for fetal granulosa cells, including *Fst*, *Foxl2*, *Cfh*, and *Podxl* (Fig. 6A,B; Suppl. Fig. 5). This suggested that loss of NR5A1 changed the molecular identity of SC at E14.5, and yielded some of them to dedifferentiate and/or transdifferentiate into earlier somatic and/or female supporting cells. Accordingly, GO terms analysis identified negative regulation of cell differentiation, cell morphogenesis involved in differentiation and regulation of Wnt signalling pathway amongst the deregulated functions (Table 1). Besides, both *Wnt4* and *Rspo1* gene expressions were up-regulated in the mutant SC (Fig. 6B), but IHC experiments failed to evidence expression of FOXL2 protein in the *Nr5a1*^{SC-/-}

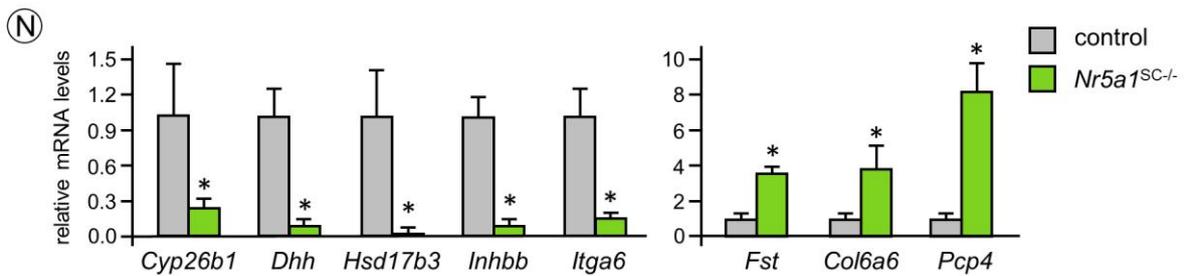
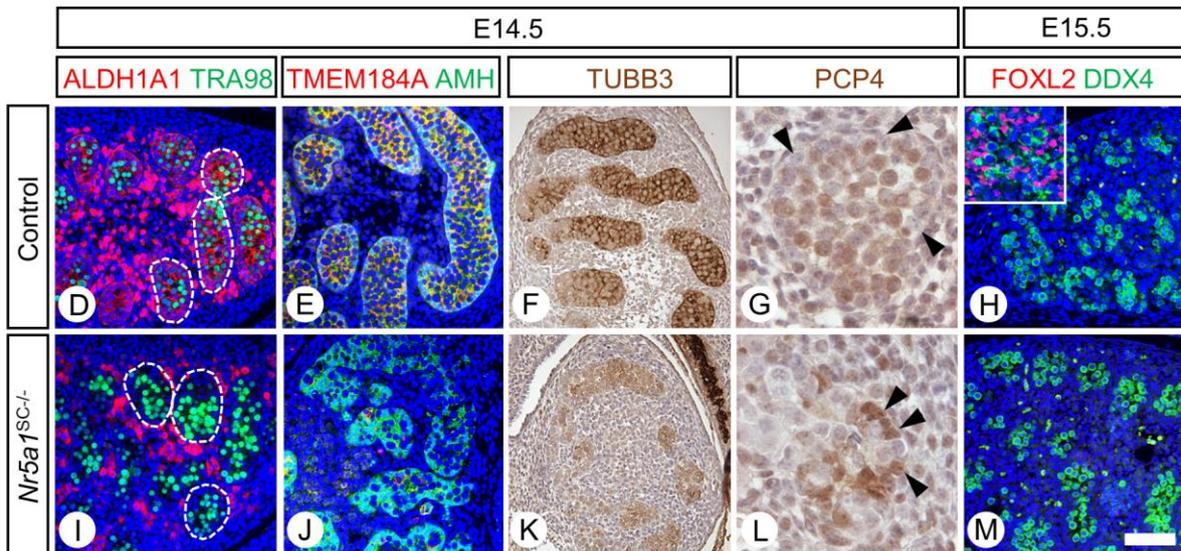
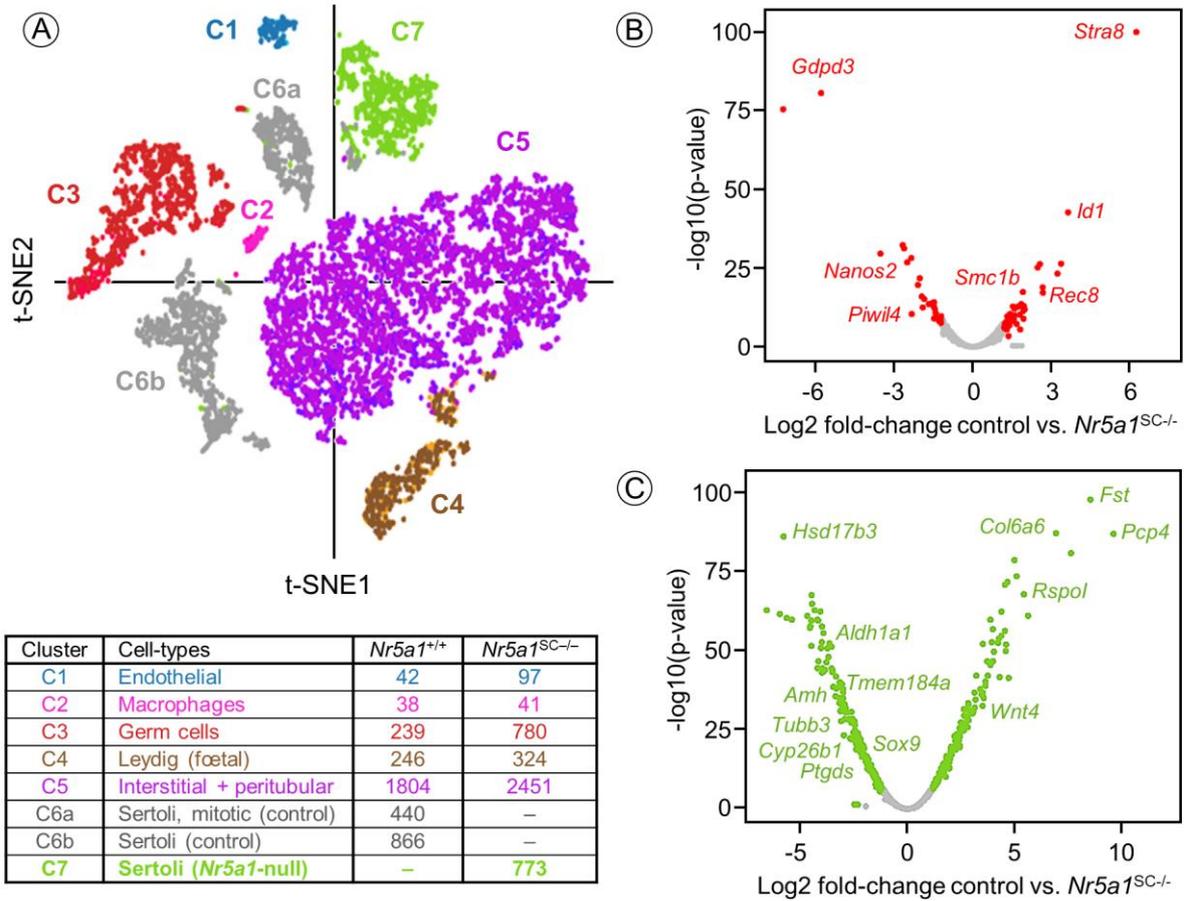


Figure 5. Single-cell transcriptome of control and *Nr5a1*^{SC-/-} testicular cells. (A) *t*-SNE plot of single cell transcriptomes from control and *Nr5a1*^{SC-/-} testes at E14.5, generated by automatic K-means clustering. The seven identified clusters (C1 to C7) are listed below, with the number of cells present in each cluster. (B) Volcano plot of differential gene expression in germ cells isolated from control and *Nr5a1*^{SC-/-} testes (red cluster C3). Red dots correspond to genes deregulated more than 1.2-fold. (C) Volcano plot of differential gene expression in Sertoli cells isolated from control (grey cluster C6b) and *Nr5a1*^{SC-/-} testes (green cluster C7). Green dots correspond to genes deregulated more than 1.2-fold. (D-M) Detection of ALDH1A1, TMEM184A, FOXL2 (red signals), TRA98, AMH, DDX4 (green signals) or TUBB3 and PCP4 (brown signals) by IHC on transverse histological sections of control (D-H) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant (I-M) testes at E14.5 (D-G, I-L) and E15.5 (H, M). In (D, E, H, I, J, M) nuclei are counterstained with DAPI (blue signal). The dotted lines (in D, I) delimit seminiferous cords. The arrowheads (in G, L) point to Sertoli cell nuclei. The insets (in H) shows detection of FOXL2 in a foetal ovary, used as a positive control for IHC. Scale bar (in M): 60 μ m (D-M). (N) RT-qPCR analyses comparing the expression levels of selected mRNAs as indicated in whole testis RNA from control (n=5) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant (n=5) fetuses at E14.5. The asterisks point to a significant difference ($p < 0.001$).

mutant testis at E15.5 (Fig. 5H,M), despite increased levels of *Foxl2* mRNA in some NR5A1-deficient SC (Fig. 6B).

To further assess whether loss of NR5A1 reverted some SC to an earlier developmental stage, we inferred cell differentiation lineages and pseudo-time from the scRNA-seq data using Slingshot and SLICE methods (Guo et al., 2017; Street et al., 2018). Reads assigned to GC, macrophages, endothelial cells, LC and GC were removed before *in silico* reconstruction. Both methods showed a linear trajectory, with an initial state for interstitial and stromal cells (cluster C5) that gives rise to differentiated SC (cluster C6b), corroborating with the established paths for testicular cell differentiation (Stévant et al., 2018; Stévant et al., 2019). Interestingly, NR5A1-deficient SC (cluster C7) stood in between C5 and C6b, suggesting a shift of their global differentiation to an earlier state than control SC (Fig. 6C). Based on stringent criteria [i.e., co-expression of 12 genes characteristic for each cell-type (Stévant et al., 2018; Stévant et al., 2019)], only 45 (5.8%) and 12 (1.6%) NR5A1-deficient SC were identified as dedifferentiated into somatic early-like and interstitial-like progenitors, respectively. In contrast, 102 mutant SC (13.2%) were identified as transdifferentiated into fetal granulosa-like cells (Fig. 6D). Of note, 39 mutant SC (5.1%) expressed genes for more than one of these cell-types, with a strong bias (i.e., 33 cells out of 39) towards the granulosa-like cell-type. Together, this indicated that loss of NR5A1 in SC induced expression of genetic program similar to granulosa-like or early-like progenitor cells in an appreciable proportion of them, with some displaying a mixed and/or an aberrant differentiation status.

***Nr5a1*-deficient SC progressively die through a TRP53-independent mechanism.**

Using the YFP-reporter to visualize SC, we highlighted a progressive decrease of the surface occupied by SC in histological sections of *Nr5a1*^{SC-/-} testis (Fig. 7A-D). At E14.5, the ratio of SC surface (green pixels) to whole surface (blue pixels) was about 30% lower in the mutant versus the control testes [28.3 ± 3.8 (n=5) versus 37.9 ± 2.5 (n=5), respectively; $p < 0.01$]. This

suggested that *Nr5a1*-deficient SC had either progressively shut down expression of YFP or disappeared from the testis. To discriminate between these two possibilities, we analysed the genomic DNA extracted from the mutant testes at birth. We reasoned that if SC had shut down YFP expression but were still present, then the cre-recombined *Nr5a1* allele should still be detected in the DNA from the whole testis. On the opposite, if SC were lost from the testis, then it should not be detected. Amplification of testis genomic DNA by PCR showed that the cre-recombined, L- allele, could be detected in the testis of a new-born bearing one copy of *Plekha5*^{Tg(AMH-cre)¹Flor} transgene and heterozygote for *loxP*-flanked allele of *Nr5a1* (i.e., *Nr5a1*^{SC+/-}), but not in that of a new-born homozygous for the *loxP*-flanked *Nr5a1* allele (i.e., a *Nr5a1*^{SC-/-} mutant) (Fig. 7M). This finding indicated that *Nr5a1*-deficient SC were actually lost from the mutant testis. In agreement with this possibility BrdU-positive SC were scarce in the *Nr5a1*^{SC-/-} testes at E14.5 and E15.5, while they were frequently observed in control testes (arrowheads, compare Fig. 2B,C with E,F). In addition, numerous cells displaying features of SC, i.e., located at the periphery of the testis cords, and laying amongst the YFP-positive or the GATA4-expressing SC (Fig. 7E-H) were TUNEL-positive (arrowheads) in E14.5 *Nr5a1*^{SC-/-} testis. From post-natal day 2 (PN2) onwards, the mutant testes lacked SC-surrounded seminiferous tubules but were composed almost exclusively of interstitial and LC (Suppl. Fig. 6A-C). Altogether these findings indicate that NR5A1-deficient SC progressively stop proliferating and died.

A recent study using an alternative mouse model proposes that NR5A1 deficiency yield SC death through a mechanism involving TRP53 (Anamthatmakula et al., 2019). To test for this possibility in our model, we first performed IHC to visualise expression of TRP53 in the fetal testis. The TRP53 protein was readily detected in almost all GC, but not in SC. The possibility however existed that TRP53 was functional in SC despite a level of expression below the detection limit by IHC, notably in the *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testes (Fig. 7I-L). According to this scenario, the loss of TRP53 in NR5A1-deficient SC should prevent their death. To test for this possibility, we introdu

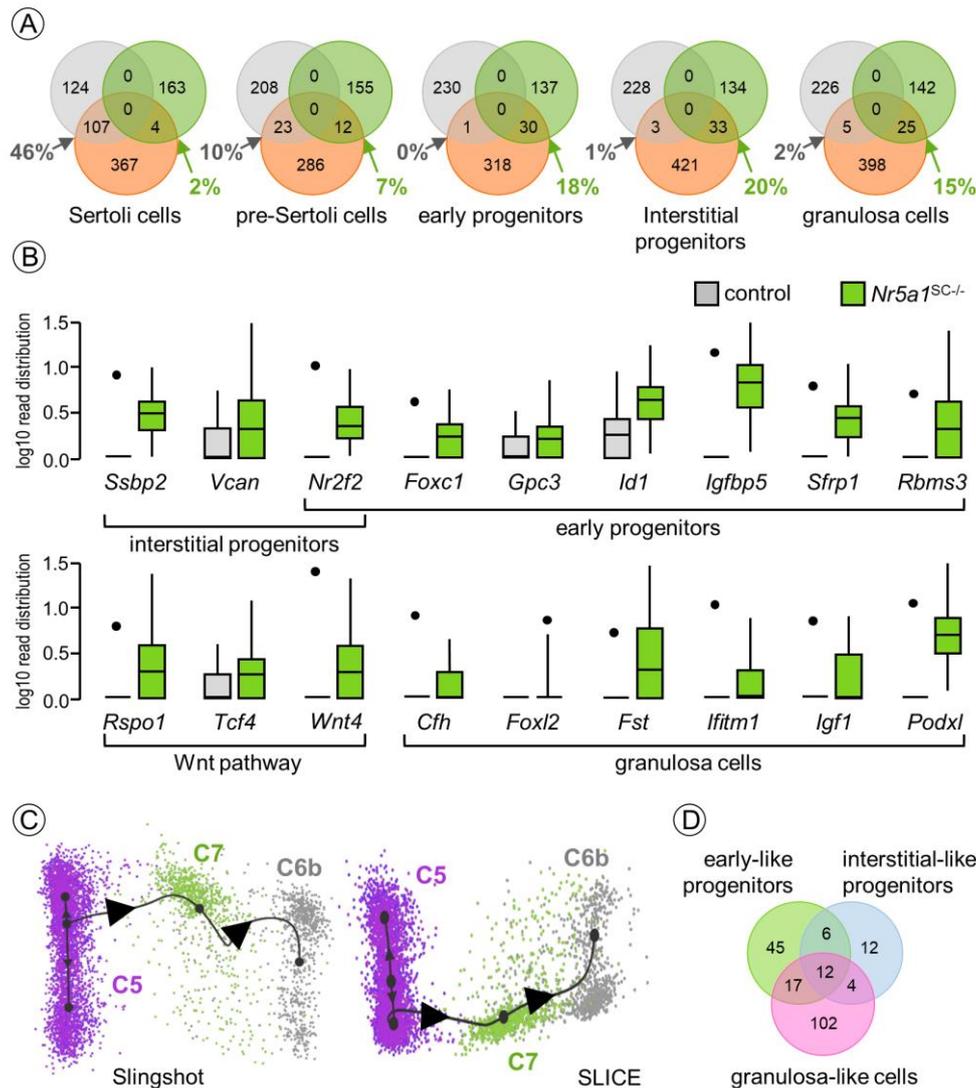


Figure 6. Differentially expressed genes in NR5A1-deficient Sertoli cells. (A) Venn diagrams showing the overlaps between the list of genes which are down-regulated (grey circles), or up-regulated (green circles) and the sets of genes characterizing the fetal testicular cell populations, as indicated (orange circles). (B) Tukey box plots illustrating medians, ranges and variabilities of log₂ expression of the indicated genes. (C) Inferred cell lineage and pseudo-time using Slingshot (left panel) and SLICE (right panel) methods. Clusters are identified as defined (C5, interstitial + peritubular cells; C6b, control Sertoli cells; and C7, mutant Sertoli cells), using the same colour code as in Fig. 5. Pseudo-time analysis provides an arrow vectors, which puts in order clusters C5, C7 and C6b. (D) Venn diagram showing the number of NR5A1-deficient SC expressing simultaneously 12 genes that are characteristic of somatic early progenitor cells (i.e., *Aldh1a2*, *Ezr*, *Foxc1*, *Fras1*, *Gas1*, *Gpc3*, *Id1*, *Igfbp5*, *Meis1*, *Ncam1*, *Rbms3* and *Sfrp1*), interstitial progenitor cells (i.e., *Bgn*, *Col3a1*, *Col5a2*, *Fn1*, *Loxl1*, *Lrp1*, *Lum*, *Pmp22*, *Ssbp2*, *Tgfb2*, *Tril*, and *Vcan*) or fetal granulosa cells (i.e., *Adam10*, *Apoe*, *Col6a6*, *Emx2*, *Fst*, *Itm2b*, *Maged2*, *Parvb*, *Podxl*, *Rspo1*, *Tmem176b* and *Tmsb4x*) according to Stévant et al., 2018 and Stévant et al., 2019. Out of 773 mutant SC, 45 are identified as early-like progenitors (green circle), 12 as interstitial-like progenitors (blue circle), and 102 as fetal granulosa-cells (pink circles). A total of 39 cells cannot be assigned to a specific-like cell-type because they express overlapping combinations.

-ced a conditional allele of *Trp53* gene (Jonkers et al., 2001) in the *Nr5a1*^{SC-/-} mutants additionally bearing the YFP reporter transgene. The efficiency of *Trp53* ablation by cre was assessed by PCR on genomic DNA extracted from fluorescence-activated cell sorting (FACS)-purified YFP-positive SC (Suppl. Fig. 6G). *Nr5a1*^{SC-/-}; *Trp53*^{SC-/-} mutants displayed poorly defined testis cords at E14.5. The surface occupied by SC was less than in control testes,

and most of these mutant SC had lost expression of SOX9 (Fig. 7O). Within seminiferous cords, many GC were STRA8-positive, indicating they had initiated meiosis instead of becoming quiescent (Fig. 7Q). In addition, testes of *Nr5a1*^{SC-/-}; *Trp53*^{SC-/-} mutants lacked seminiferous tubules at PN15 and contained mainly interstitial cells, including HSD3B1-positive LC (Suppl. Fig. 6D-F). All these features faithfully recapitulated the phenotype displayed by

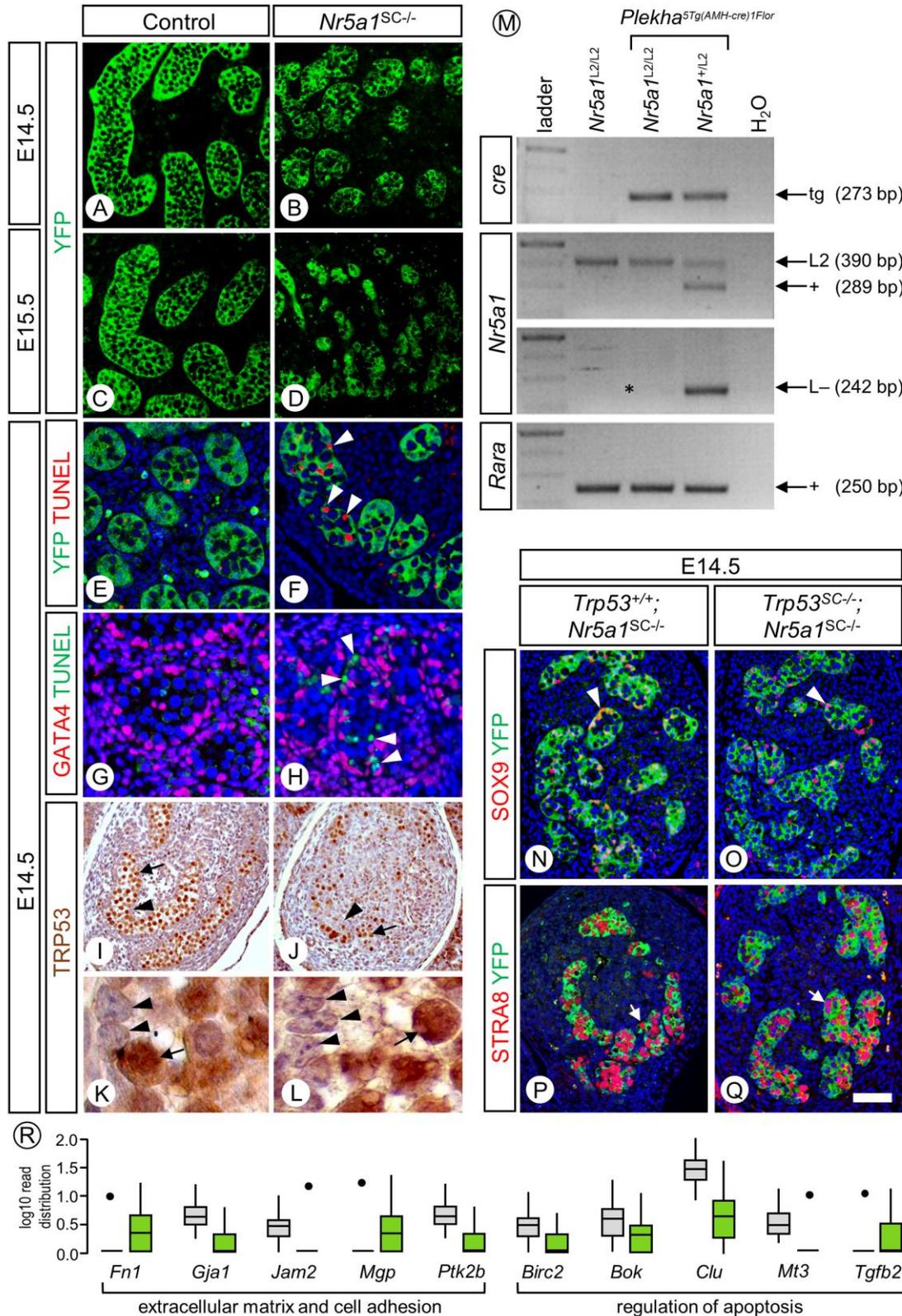


Figure 7. NR5A1-deficient Sertoli cells die even when additionally lacking TRP53. (A-F) Detection of YFP (green signal) and TUNEL-positive cells (red signal) on histological sections of the testis of control (A,C,E) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant fetuses (B,D,F) at E14.5 (A,B,E,F) and E15.5 (C,D). (G,H) Detection of GATA4 (red signal) and TUNEL-positive cells (green signal) on histological sections of control (G) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testes (H) fetuses at E14.5. In (E-H) nuclei are counterstained with DAPI (blue signal). Arrowheads (in F,H) point to TUNEL-positive cells, which are likely to be Sertoli cells. (I-L) Detection of TRP53 (brown signals) on histological sections of control (I,K) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant (J,L) testes at E14.5. (M) PCR analysis of genomic DNA extracted from control (*Nr5a1*^{L2/L2}), mutant (*Plekha5*^{Tg(AMH-cre)1Flor}; *Nr5a1*^{L2/L2}) and heterozygote (*Plekha5*^{Tg(AMH-cre)1Flor}; *Nr5a1*^{+/L2}) testes of newborns. Upper panel shows genotyping of *Cre* transgene; middle panel shows genotyping of *Nr5a1* alleles; lower

panel shows genotyping of *Rara* locus, attesting for an equivalent of DNA in each lane. The sizes of the expected fragments are indicated on the right: tg, Cre transgene; L2 and +, loxP-flanked and wild-type alleles, L-, excised, null allele. Note that the mutant testis contains only traces of the *Nr5a1* L- allele (asterisk), indicating that Sertoli cells bearing the excised allele are no longer present at birth. (N-Q) Detection of SOX9, STRA8 (red signals) and YFP (green signal) by IHC on histological sections of *Nr5a1*^{SC-/-} (N,P) and *Nr5a1*^{SC-/-}; *Trp53*^{SC-/-} (O,Q) mutants at E14.5. In (H,J,N-O) arrowheads and arrows point to Sertoli cells and germ cells, respectively. (R) Tukey box plots illustrating medians, ranges and variabilities of log2 expression of the indicated genes. Scale bar (in Q): 60 μm (A-D and N-Q), 50 μm (D,F), 40 μm (G,H), 80 μm (I,J), 10 μm (K,L).

Nr5a1^{SC-/-} mutants (Fig. 7N,P; Suppl. Fig. 6B,E), indicating that NR5A1-deficient SC eventually died even though they lacked TRP53.

GO terms analysis of the genes differentially expressed between control (C6b) and NR5A1-deficient SC (C7) highlighted extra-cellular matrix (ECM), collagen-containing matrix, integrin signalling pathway and integrin-cell surface interactions, regulation of cell-substrate adhesion, basement membrane, as well as cell communication, migration, cytoskeleton organization, cell junctions and regulation of cell shape (Table 1). The expression level of some genes involved in ECM (e.g., *Fn1*, *Mgp*) were up-regulated, while others involved in cell junctions (e.g., *Gja1*, *Jam2*), and integrin signalling (e.g., *Itga6*, *Ptk2b*) were down-regulated (Fig. 7R; see also Fig. 5N). The expression of collagen genes also was up (e.g., *Col3a1*, *Col5a2*, *Col6a6*), while that of other ones was down, including *Col4a1*, *Col4a2*, *Col9a2* (Suppl. Fig. 5). This latter point was in agreement with the disorganization of the seminiferous cords and the loss of COL-IV expression observed at their periphery in *Nr5a1*^{SC-/-} mutant testes (see above, Fig. 4). Together these findings suggested that NR5A1-deficient SC lost their normal architecture, as well as their appropriate cell-cell and cell-ECM interactions, all of which can lead to anoikis (a.k.a., “integrin-mediated death” or “detachment-induced apoptosis”; Gilmore et al., 2009; Vachon, 2011), a form of programmed cell-death “”. Accordingly, regulation of apoptotic process was identified amongst the most deregulated functions by GO term analysis (Table 1), and the expression of genes involved in the negative regulation of apoptosis was decreased in mutant SC of cluster C7 (e.g., *Birc2*, *Bok*, *Clu*, and *Mt3*), while the expression of genes involved in its positive regulation (e.g., *Tgfb2*, *Pcp4*) was increased (Fig. 7R; see also Fig. 5N). Importantly, TRP53 is not essential for anoikis, because this type of cell-death still occurs in *Trp53*-deficient cells (McGill et al., 1997).

Nr5a1^{SC-/-} mutant males exhibit Müllerian duct retention

In normal males, AMH is essential to initiate regression of the Müllerian ducts and to prevent their development into female reproductive tract structures (Josso et al., 1998). To analyse the outcome of the lack of AMH production *Nr5a1*^{SC-/-} mutant males were analysed at PN60. All mutant

males were sterile and had a shorter anogenital distance (AGD) index [0.30 ± 0.03 mm/g of body weight (n=16) in controls, 0.36 ± 0.02 mm/g (n=17) in mutant; $p < 0.001$] (Fig. 8A,C). At autopsy (n = 8), they displayed small testes as well as all the normal derivatives the Wolffian ducts (i.e., epididymis, vas deferent, seminal vesicle, ampullary glands) and of the male urogenital sinus (i.e., lobes of the prostate), (Fig. 8E,F). They also displayed Müllerian duct derivatives (Fig. 8F-H), namely a vagina, a short uterine body and bilateral, uterine horns, which were incomplete and truncated (6 out of 8), or complete on the right side (2 out of 8). Histological analysis revealed that the uterine body displayed a monolayer, columnar epithelium (Fig. 8I), while the vagina displayed a stratified, squamous epithelium (Fig. 8J).

When compared to control males, *Nr5a1*^{SC-/-} mutant males also had lighter seminal vesicles [4.71 ± 1.66 mg/g of body weight (n=17), versus 7.43 ± 1.22 mg/g (n=16) in controls; $p < 0.05$] and a shorter penis [length was 6.7 ± 0.4 mm (n=17) versus 7.5 ± 0.3 mm (n=16) in controls; $p < 0.05$] (Fig. 8B,D). As AGD, seminal vesicle growth and penis bone length vary as a function of androgen exposure (Hotchkiss & Vandenberg, 2005; Shima et al., 1990; Rodriguez et al., 2012), we analysed blood testosterone levels in *Nr5a1*^{SC-/-} mutants. They were comparable to that of controls at PN60 [0.38 ± 0.17 ng/ml (n=17), versus 0.43 ± 0.23 ng/ml serum (n=16) in control males; $p = 0.68$], and at birth [0.25 ± 0.17 ng/ml (n=10), versus 0.22 ± 0.10 ng/ml serum (n=10) in control males; $p = 0.59$].

MATERIALS AND METHODS

Mice

Mice were on a mixed C57BL/6 (50%)/129/SvPass (50%) genetic background. They were housed in a licensed animal facility (agreement #C6721837). All experiments were approved by the local ethical committee (Com'Eth, accreditation APAFIS#18323- 2018113015272439_v3), and were supervised by N.B.G., M.M. and N.V., who are qualified in compliance with the European Community guidelines for laboratory animal care and use (2010/63/UE).

The *Nr5a1* conditional mutant mouse line was established at the Institut Clinique de la Souris (iCS, Illkirch, France), in the context of the French

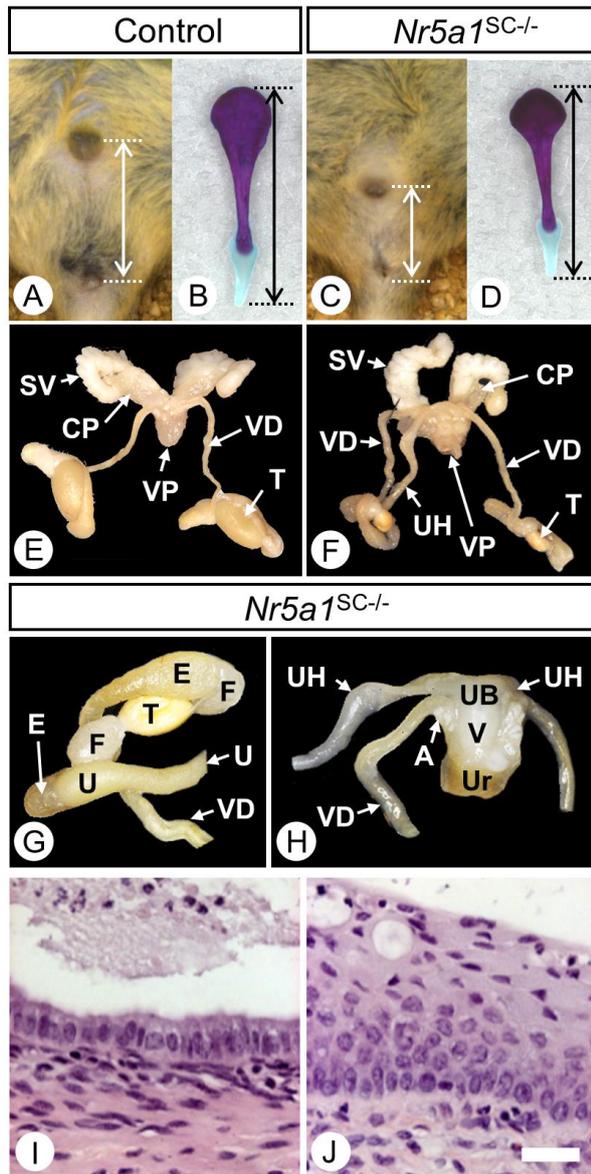


Figure 8. Abnormal external genitalia and Müllerian duct retention in *Nr5a1*^{SC-/-} males. (A,C) Anogenital distance in control and *Nr5a1*^{SC-/-} males at PN60. (B,D) Penis bones dissected from control and *Nr5a1*^{SC-/-} males at PN60 and stained with alizarin red and alcian blue. (E-H) Reproductive tracts of control (E) and *Nr5a1*^{SC-/-} (F-H) males at PN60. (I-J) Histological sections from the *Nr5a1*^{SC-/-} mutant sample shown in (H) and stained by H&E. The uterine surface consists of a simple columnar epithelium and the vaginal epithelium is typically stratified squamous. Legend: A, ampullary gland; CP, cranial prostate; E, epididymis; F, fat pad; SV, seminal vesicle; T, testis; UH, uterine horn; Ur, urethra; V, vagina; VD, vas deferens; VP, ventral prostate. Scale bar (in J): 30 μ m (I,J).

National Infrastructure for Mouse Phenogenomics PHENOMIN (<http://www.phenomin.fr>). To construct the targeting vector a 1.9 kb-long DNA fragment encompassing exon 7 (ENSMUSE00000693512) was amplified by PCR using 129/SvPass genomic DNA and cloned into an iCS proprietary vector containing a *loxP* site, as well as a *loxP*- and *FRT*-flanked neomycin resistance cassette (step 1 plasmid). Then, 3 kb- and 3.7 kb-long fragments corresponding to 5' and 3'

homology arms were amplified by PCR and introduced into step1 plasmid to generate the targeting construct. This linearized construct was electroporated into 129/SvPass mouse embryonic stem (ES) cells. After selection, targeted clones were identified by PCR using external primers and confirmed by Southern blots (5' and 3' digests) hybridized with neomycin, 5' and 3' external probes. One positive ES clone was injected into C57BL/6J blastocysts. To remove the selection cassette from the *Nr5a1* locus, chimeric males were crossed with *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)}Cos* females (Rodriguez et al., 2000). Germline transmission was obtained, and a further breeding step was needed to segregate animals bearing the *Nr5a1* L2 allele from animals bearing the transgene. To inactivate *Nr5a1* in Sertoli cells, female mice bearing *Plekha5*^{Tg(AMH-cre)¹Flor} (Lécureuil et al., 2002) and *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)}Cos* (Srinivas et al., 2001) transgenes, and heterozygous for the L2 allele of *Nr5a1* were mated with males heterozygous or homozygous for L2 alleles of *Nr5a1*. To test for the role of TRP53, the L2 allele of *Trp53* gene (Jonkers et al., 2001) was further introduced in the mice described above.

Noon of the day of a vaginal plug was taken as 0.5 day embryonic development (E0.5). Fetuses were collected by caesarean section. Yolk sacs or tail biopsies were taken for DNA extraction. Primers 5'-GTCAAGCGCCCCATGAATGC-3' and 5'-TTAGCCCTCCGATGAGGCTG-3' were first used to amplify *Sry* gene (230 bp-long fragment) for male sex determination. Then, primers 5'-TGAGCCCTGGCACATCCCTCC-3' and 5'-CCTC TGCCCTGCAGGCTTCTG-3' were used to detect *Plekha5*^{Tg(AMH-cre)¹Flor} transgene (273 bp-long amplicon), and primers 5'-AAGGGAGCTGCAGT GGAGTA-3' and 5'-GCCAGAGGCCACTTGTGT AG-3' to detect *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)}Cos* reporter (520 bp-long amplicon). Primers 5'-CTGTCTC CTGTCTTCTACTACCCTG-3' and 5'-AGCCATT TCAACAGTGGCCCTTCC-3' primers were used to amplify wild-type (+, 290 bp-long) and L2 (400 bp-long) alleles of *Nr5a1*, while primers 5'-GTGGCACA TGCATTAGTCCACTTGG-3' and 5'-AGCCATTTCAACAGTGGCCCTTCC-3' primers were used to amplify the excised, null, L- (243 bp-long) allele. Primers 5'-CACAAAACAGGTTA AACCCAG-3' and 5'-AGCACATAGGAGGCAGA GAC-3' were used to amplify the wild-type (288 bp-long) and L2 (370 bp-long) alleles of *Trp53*. Primers 5'-CACAAAACAGGTTAAACC CAG-3' and 5'-GAAGACAGAAAAGGGGAGGG-3' were used to amplify the excised, null, L- (612 bp-long) allele of *Trp53*. The PCR conditions were 30 cycles with denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 61°C for 30 seconds and elongation at 72°C for 30 seconds. The amplicons were resolved on 1.5% (w/v) agarose gels, stained

by ethidium bromide and visualized under UV light, using standard protocols.

External morphology, histology and immunohistochemistry

Adult mice (9-11 weeks of age) were anesthetized by intraperitoneal injection of a lethal anesthetic mixture made of Xylasin (3 mg/ml) and Ketamine (20 mg/ml), and tissues were immediately fixed by intracardiac perfusion of 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) dissolved in phosphate buffered saline (PBS). Following collection, E12.5-E15.5 fetuses were fixed for 16 hours in 4% (w/v) PFA at 4°C or in Bouin's fluid at 20°C. After removal of the fixative, samples were rinsed in PBS and placed in 70% (v/v) ethanol for long-term storage, external morphology evaluation and organ weight measurement. They were next embedded in paraffin and 5 µm-thick sections were made. For histology, sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

For fluorescent IHC, antigen were retrieved for 1 hour at 95°C either in 10 mM sodium citrate buffer at pH 6.0 or in Tris-EDTA at pH 9.0 [10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, 0.05% (v/v) Tween 20]. Sections were rinsed in PBS, then incubated with appropriate dilutions of the primary antibodies (**Table 2**) in PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBST) for 16 hours at 4°C in a humidified chamber. After rinsing in PBST (3 times for 3 minutes each), detection of the bound primary antibodies was achieved for 45 minutes at 20°C in a humidified chamber using Cy3-conjugated or Alexa Fluor 488-conjugated antibodies. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted at 10 µg/ml in the mounting medium (Vectashield; Vector Laboratories). In some cases, ImmPRESS® Polymer Detection Kits MP-7500 and MP-7405 (Vector Laboratories) were also used according to the manufacturer's protocol.

The surface area occupied by YFP-positive cells was measured using a macro command designed for Fiji software (Imaging Center of IGBMC). Data were expressed as percentages of YFP-positive surface areas relative to entire testis section surface areas. At least four samples were analyzed per genotype. Statistical analysis was done by a two-tail Student *t*-test, assuming equal variances after arcsine transformation of the percentages.

BrdU incorporation and TUNEL assays.

BrdU (Sigma-Aldrich, B9285) dissolved at 5 mg/ml in PBS was injected intraperitoneally to pregnant females at 50 mg/kg of body weight. Two hours later, fetuses were collected (E13.5-E15.5), fixed and embedded as described above. BrdU

incorporation was detected on 5 µm-thick sections by using an anti-BrdU mouse monoclonal antibody (diluted 1:100; Roche) and indirect immunofluorescence labelling as described above. At least three samples per stage and per genotype were analyzed. Data were expressed as percentages of BrdU- and DDX4-positive cells related to the number of DDX4-positive cells. Statistical analysis was done by a two-tail Student *t*-test, assuming equal variances after arcsine transformation of the percentages.

TUNEL-positive cells were detected on sections from PFA-fixed samples using the In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche), according to the manufacturer's instructions. At least three samples were analyzed per genotype. Data were expressed as the ratio between the number of TUNEL-positive cells quantified on entire sections and the surface areas of the testis sections (µm²). Statistical significance was assessed by using two tail Student's *t*-tests.

Real-time RT-qPCR analyses of RNA extracted from whole gonad

Fetal testes were dissected, isolated from mesonephros, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Whole testis total RNA were extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen). RT-qPCR was performed on 5 ng RNA aliquots using Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs), according to the manufacturer's instructions. The primers are listed in **Table 3**. Triplicates of at least four samples were used for each genotype at each stage. The relative transcript levels were determined using the $\Delta\Delta C_t$ method, and normalized to *Hprt* whose expression is not affected by ablation of *Nr5a1*.

Purification of YFP-positive Sertoli cells by FACS

To dissociate cells, the testes of control and mutant mice additionally bearing the *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}* transgene were incubated for 10 minutes at 37°C in 350 µl of trypsin/EDTA 0.05% (w/v), phenol red solution (Gibco Ref 25300), filtered through a 40 µm cell strainer to generate single cell suspensions, centrifuged at 3000g and suspended in 300 µl PBS as described (Stévant et al., 2018). The YFP-positive and -negative cells were sorted separately by FACS using an Aria® II flow cytometer. Sorted cell suspensions were then lysed for overnight at 55°C in a proteinase K-containing buffer, DNA was extracted and genotyped by PCR using standard protocols and primers as indicated above.

Single cell RNA sequencing and data processing

Gonads from E13.5 and E14.5 control and mutant fetuses were dissected out in PBS, sexed

by their appearance under the microscope and cell suspensions were prepared as described above. Cell number and viability were determined by a Trypan Blue exclusion assay on a Neubauer Chamber. Samples consisting of > 90% viable cells were processed on the Chromium Controller from 10X Genomics (Leiden, The Netherlands). Ten thousand cells were loaded per well to yield approximately 5000 to 6000 captured cells into nanoliter-scale Gel Beads-in-Emulsion (GEMs). Single cell 3' mRNA sequencing libraries were generated according to Chromium Single Cell 3' Reagent Kits User Guide (v3 Chemistry) from 10X Genomics. Briefly, GEMs were generated by combining barcoded gel beads, a reverse transcription master mix containing cells, and partitioning oil onto Chromium Chip B. Following full length cDNA synthesis and barcoding from poly-adenylated mRNA, GEM were broken and pooled before cDNA amplification by PCR using 11 cycles. After enzymatic fragmentation and size selection, sequencing libraries were constructed by adding Illumina P5 and P7 primers (Paris, France), as well as sample index via end repair, A tailing, adaptor ligation and PCR with 10 cycles. Library quantifications and quality controls were determined using Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara CA). Libraries were then sequenced on Illumina HiSeq 4000™ as 100 bases paired-end reads, using standard protocols.

Sequencing data were processed using 10X Genomics software (<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/overview/welcome>). Briefly, 3'-end mRNA-sequencing library reads were processed using Cell Ranger count pipeline (version 3.1.0), on a chimeric genome composed of mm10 *Mus musculus* assembly and 753 bp-long YFP sequence [European Nucleotide Archive (ENA) accession number AGM20711; Aliye et al., 2015]. Annotations used for mm10 were from Ensembl version 99. Then, Cell Ranger aggr was used in order to merge data into a single count matrix and cloupe file. The resulting file was analysed using Loupe Cell Browser (version 4.1.0) to remove cells expressing high level of mitochondrial genes. A new cloupe file has been then generated using Cell Ranger reanalyse. Differential gene expression analysis has been performed using Loupe Cell Browser. For trajectory computation, cells that express more than 15% of mitochondrial genes and cells that belong to clusters C1 to C4 (Fig. 5A) were removed before trajectory analysis. Final dataset includes 5748 cells. Then, counts have been normalized using LogNormalize method implemented in the Seurat R package, version 3.1.5 (Butler et al., 2018; Stuart et al., 2019). Trajectories have been computed on normalized counts using Slingshot (Street et al., 2018) and SLICE (Guo et al., 2017) algorithms

implemented in the dyno R package version 0.1.2 (Saelens et al., 2019). The resulting trajectories have been rooted on a specific node to each trajectory.

Blood sample collection and testosterone measurement

After anesthesia with a lethal dose of Xylasin and Ketamine as described above, the blood of 9-11 week-old adult mice was collected into heparinized Microvette tubes (Sarstedt) by intracardiac sampling. The tubes were then centrifuged at 5000 g for 5 minutes and the resulting plasma samples were frozen until further use. Testosterone concentrations were determined by ELISA using a commercially available kit (LDN Germany, Ref. AR E-8000). Statistical significance was further assessed by using two-tail Student's *t*-tests.

Acknowledgements

The *Nr5a1* mouse mutant line was established at the Institut Clinique de la Souris (iCS) in the Genetic Engineering and Model Validation Department with funds from the ANR (see below). We thank Pr Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ for discussions and advices. We also thank Dr Christelle Thibault-CARPENTIER from the Genomeast platform for her input (<http://genomeast.igbmc.fr/>). This work was supported by grants from CNRS, INSERM, UNISTRA and Agence Nationale pour la Recherche project ARESSERC (ANR-16-CE14-0017). It was also supported in part by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the ANR under the frame programme Investissements d'Avenir labelled ANR-10-IDEX-0002-02.

References

- Aliye N, Fabbretti A, Lupidi G, Tsekoa T, Spurio R. (2015). Engineering color variants of green fluorescent protein (GFP) for thermostability, pH-sensitivity, and improved folding kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**(3):1205-16. PMID:25112226.
- Anamthathmakula P, Miryala CSJ, Moreci RS, Kyathanahalli C, Hassan SS, Condon JC, Jeyasuria P. (2019). Steroidogenic Factor 1 (Nr5a1) is Required for Sertoli Cell Survival Post Sex Determination. *Sci. Rep.* **9**(1):4452. PMID:30872705
- Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. (2012). Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid. Redox Signal.* **16**(10):1150-80. PMID:21967640
- Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lécureuil C, Guillou F, Wegner M, Scherer G. (2009). Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev. Biol.* **327**(2):301-12. PMID:19124014
- Best D, Sahlender DA, Walther N, Peden AA, Adams IR. (2008). Sdmg1 is a conserved transmembrane protein associated with germ cell sex determination and germline-soma interactions in mice. *Development* **135**(8):1415-25. PMID:18321981

- Buganim Y, Itskovich E, Hu YC, Cheng AW, Ganz K, Sarkar S, Fu D, Welstead GG, Page DC, Jaenisch R. (2012). Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors. *Cell Stem Cell* **11**(3):373-86. [PMID:22958931](#)
- Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexis E, Satija R. (2018). Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* **36**(5):411-20. [PMID:29608179](#)
- De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell Biol.* **18**(11):6653-65. [PMID:9774680](#)
- Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto H, Furusawa M, Noce T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(25):12258-62. [PMID:7991615](#)
- Georg I, Barrionuevo F, Wiech T, Scherer G. (2012). Sox9 and Sox8 are required for basal lamina integrity of testis cords and for suppression of FOXL2 during embryonic testis development in mice. *Biol. Reprod.* **87**(4):99. [PMID:22837482](#)
- Gilmore AP, Owens TW, Foster FM, Lindsay J. (2009). How adhesion signals reach a mitochondrial conclusion - ECM regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**(5):654-61. [PMID:19570669](#)
- Guo M, Bao EL, Wagner M, Whitsett JA, Xu Y. (2017). SLICE: determining cell differentiation and lineage based on single cell entropy. *Nucleic Acids Res.* **45**(7):e54. [PMID:27998929](#)
- Hotchkiss AK, Vandenberg JG. (2005). The anogenital distance index of mice (*Mus musculus domesticus*): an analysis. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* **44**(4):46-8. [PMID:16050669](#)
- Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat. Genet.* **29**(4):418-25. [PMID:11694875](#)
- Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F. (1998). The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **145**(1-2):3-7. [PMID:9922092](#)
- Lécureuil C, Fontaine I, Crepieux P, Guillou F. (2002). Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* **33**(3):114-8. [PMID:12124943](#)
- McGill G, Shimamura A, Bates RC, Savage RE, Fisher DE. (1997). Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **138**(4):901-11. [PMID:9265655](#)
- Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, Marzi L, Cohen-Solal A, Georg I, Klattig J, Englert C, Kim Y, Capel B, Eguchi N, Urade Y, Boizet-Bonhoure B, Poulat F. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* **136**(11):1813-21. [PMID:19429785](#)
- Osswald & Morais-de-Sá, 2019 Osswald M, Morais-de-Sá E. (2019). Dealing with apical-basal polarity and intercellular junctions: a multidimensional challenge for epithelial cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **60**:75-83. [PMID:31153057](#)
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.* **25**(2):139-40. [PMID:10835623](#)
- Rodriguez E Jr, Weiss DA, Ferretti M, Wang H, Menshenia J, Risbridger G, Handelsman D, Cunha G, Baskin L. (2012). Specific morphogenetic events in mouse external genitalia sex differentiation are responsive/dependent upon androgens and/or estrogens. *Differentiation* **84**(3):269-79. [PMID:22925506](#)
- Saelens W, Cannoodt R, Todorov H, and Saeys Y. (2019). A comparison of single-cell trajectory inference methods. *Nat. Biotechnol.* **37**(5):547-54. [PMID:30936559](#)
- Sekido R, Lovell-Badge R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* **453**(7197):930-4. [PMID:18454134](#)
- Shima H, Tsuji M, Young P, Cunha GR. (1990). Postnatal growth of mouse seminal vesicle is dependent on 5 alpha-dihydrotestosterone. *Endocrinology* **127**(6):3222-33. [PMID:2249647](#)
- Srinivas et al., 2001 Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev. Biol.* **1**:4. [PMID:11299042](#)
- Stévant I, Neirijnck Y, Borel C, Escoffier J, Smith LB, Antonarakis SE, Dermitzakis ET, Nef S. (2018). Deciphering Cell Lineage Specification during Male Sex Determination with Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Rep.* **22**(6):1589-1599. [PMID:29425512](#)
- Stévant I, Kühne F, Greenfield A, Chaboissier MC, Dermitzakis ET, Nef S. (2019). Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep.* **26**(12):3272-3283.e3. [PMID:30893600](#)
- Street K, Risso D, Fletcher RB, Das D, Ngai J, Yosef N, Purdom E, Dudoit S. (2018). Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics* **19**(1):477. [PMID:29914354](#)
- Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexis E, Mauck WM 3rd, Hao Y, Stoekius M, Smibert P, Satija R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**(7):1888-1902. [PMID:31178118](#)
- Sumi E, Iehara N, Akiyama H, Matsubara T, Mima A, Kanamori H, Fukatsu A, Salant DJ, Kita T, Arai H, Doi T. (2007). SRY-related HMG box 9 regulates the expression of Col4a2 through transactivating its enhancer element in mesangial cells. *Am. J. Pathol.* **170**(6):1854-64. [PMID:17525254](#)
- Tremblay JJ, Viger RS. (1999). Transcription factor GATA-4 enhances Müllerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol. Endocrinol.* **13**(8):1388-401. [PMID:10446911](#)
- Vachon PH. (2011). Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation. *J. Signal Transduct.* **2011**:738137. [PMID:21785723](#)
- Vernet N, Condrea D, Mayere C, Féret B, Klopfenstein M, Magnant W, Alunni V, Teletin M, Souali-Crespo S, Nef S, Mark M, Ghyselinck NB. (2020). Meiosis occurs normally in the fetal ovary of mice lacking all retinoic acid receptors. *Sci. Adv.* **6**(21):eaaz1139. [PMID:32917583](#)
- Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB, Mark M. (2006). Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* **147**(1):96-110. [PMID:16210368](#)
- Wilhelm D, Hiramatsu R, Mizusaki H, Widjaja L, Combes AN, Kanai Y, Koopman P. (2007). SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *J. Biol. Chem.* **282**(14):10553-60. [PMID:17277314](#)

Table 1. Gene ontology (GO) terms associated with genes differentially expressed between control (cluster C6b) and mutant (cluster C7) Sertoli cells

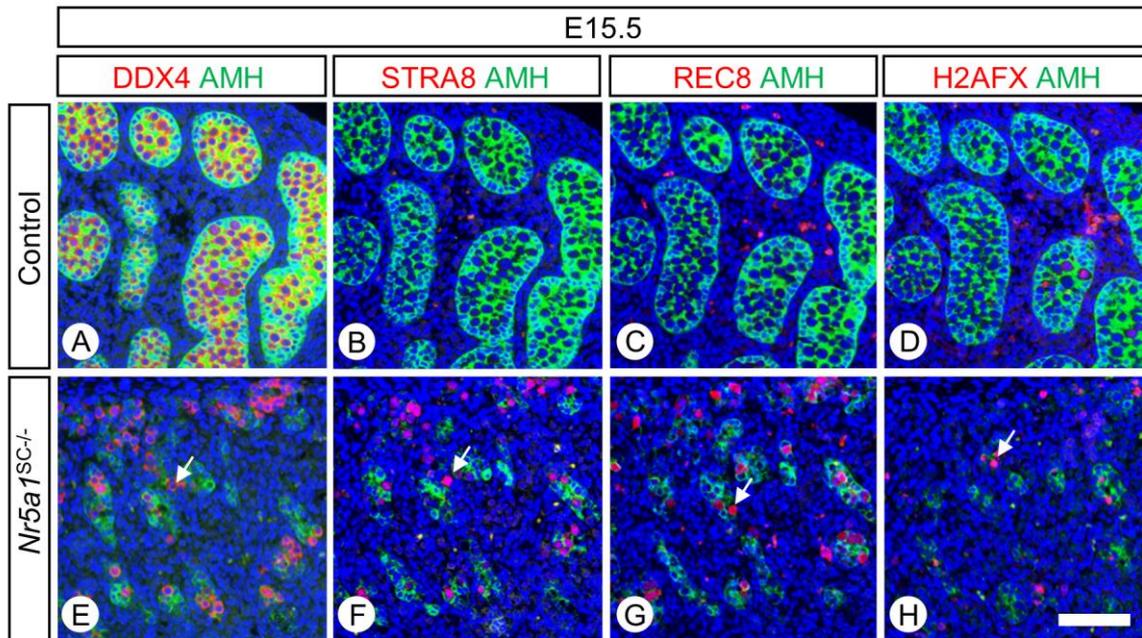
GO term	Genes down	Genes up	p value	FDR	Annotation data set
Reproductive structure/system development	18	16	9,25E-12	6,36E-09	GO biological process
Sex differentiation	11	10	7,89E-08	1,66E-05	GO biological process
Gonad development	9	9	2,38E-07	4,09E-05	GO biological process
Development of primary sexual characteristics	9	9	3,04E-07	5,02E-05	GO biological process
Regulation of cell differentiation	32	47	5,24E-13	5,92E-10	GO biological process
Negative regulation of cell differentiation	12	27	7,25E-11	4,10E-08	GO biological process
Cell morphogenesis involved in differentiation	8	21	5,36E-09	1,60E-06	GO biological process
Regulation of Wnt signalling pathway	3	15	2,35E-08	5,82E-06	GO biological process
Extracellular matrix	13	32	1,55E-17	1,52E-14	GO Cellular component
Collagen-containing extracellular matrix	9	28	8,62E-16	5,67E-13	GO Cellular component
Extracellular matrix organization	11	18	7,51E-13	1,24E-09	Reactome pathways
Integrin signalling pathway	8	10	3,08E-08	2,55E-06	PANTHER pathways
Integrin cell-surface interactions	6	6	8,22E-08	1,69E-05	Reactome pathways
Regulation of cell-substrate adhesion	5	12	1,73E-07	3,14E-05	GO biological process
Basement membrane	3	10	3,77E-07	6,20E-05	GO Cellular component
Regulation of cell communication	54	60	5,57E-12	4,20E-09	GO biological process
Regulation of cell migration	18	26	1,11E-08	2,87E-06	GO biological process
Regulation of actin skeleton organization	9	14	4,47E-07	6,94E-05	GO biological process
Cell junctions	36	30	4,60E-06	5,06E-05	GO Cellular component
Regulation of cell shape	5	8	7,23E-06	6,77E-04	GO biological process
Regulation of apoptotic process/programmed cell death	25	29	1,69E-06	2,09E-04	GO biological process
Negative regulation of apoptotic process/programmed cell death	16	22	2,95E-06	3,22E-04	GO biological process

Table 2. Primary antibodies used for immunohistochemistry experiments.

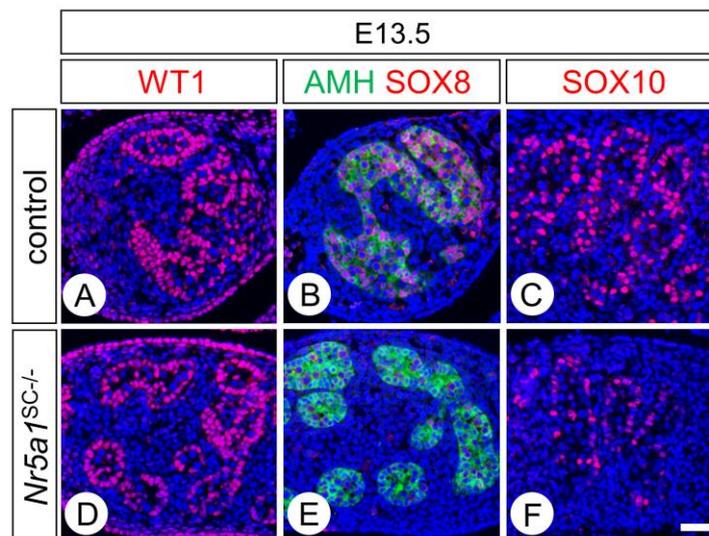
Antibodies	Species	Dilution	Source	Reference
ALDH1A1	Rabbit polyclonal	1/50	Abcam	ab52492
AMH	Goat polyclonal	1/100	Santa-Cruz	sc-6886
BrdU	Rat monoclonal	1/100	Bio Rad	OBT0030S
COL-IV	Rabbit polyclonal	1/50	Abcam	ab19808
DDX4	Rabbit polyclonal	1/2000	Abcam	ab13840
FOXL2	Goat polyclonal	1/250	Abcam	ab5096
GATA 4	Goat polyclonal	1/50	Santa-Cruz	sc-1237
H2AFX	Mouse monoclonal	1/500	Millipore	05-636 (JBW301)
HSD3B1	Rabbit polyclonal	1/1000	Trans Genic's Inc	KO607
NR5A1	Rabbit polyclonal	1/100	Cosmo Bio	KAL-KO611
PCP4	Rabbit polyclonal	1/500	Novus Biologicals	NBP1-80929
REC8	Rabbit monoclonal	1/200	Abcam	ab192241
SOX8	Mouse monoclonal	1/100	Novus Biologicals	H00030812-M01
SOX9	Rabbit polyclonal	1/1000	Sigma Aldrich	ab5535
SOX10	Goat polyclonal	1/1000	R&D Systems	AF2864
STRA8	Rabbit polyclonal	1/1000	Abcam	ab49602
TMEM184A	Rabbit polyclonal	1/200		Best et al., 2008
TRA98	Rat monoclonal	1/500	Abcam	ab82527
TRP53	Rabbit polyclonal	1/200	Santa-Cruz	sc-6243
TUBB3	Mouse monoclonal	1/1000	Covance	MMS-435P-0100 (TUUJ1 clone)
WT1	Mouse monoclonal	1/500	Cell Marque	348M-94
YFP	Chicken polyclonal	1/500	Aves	GFP-1020

Table 3. Primers used for quantification of mRNA levels by real-time RT-qPCR.

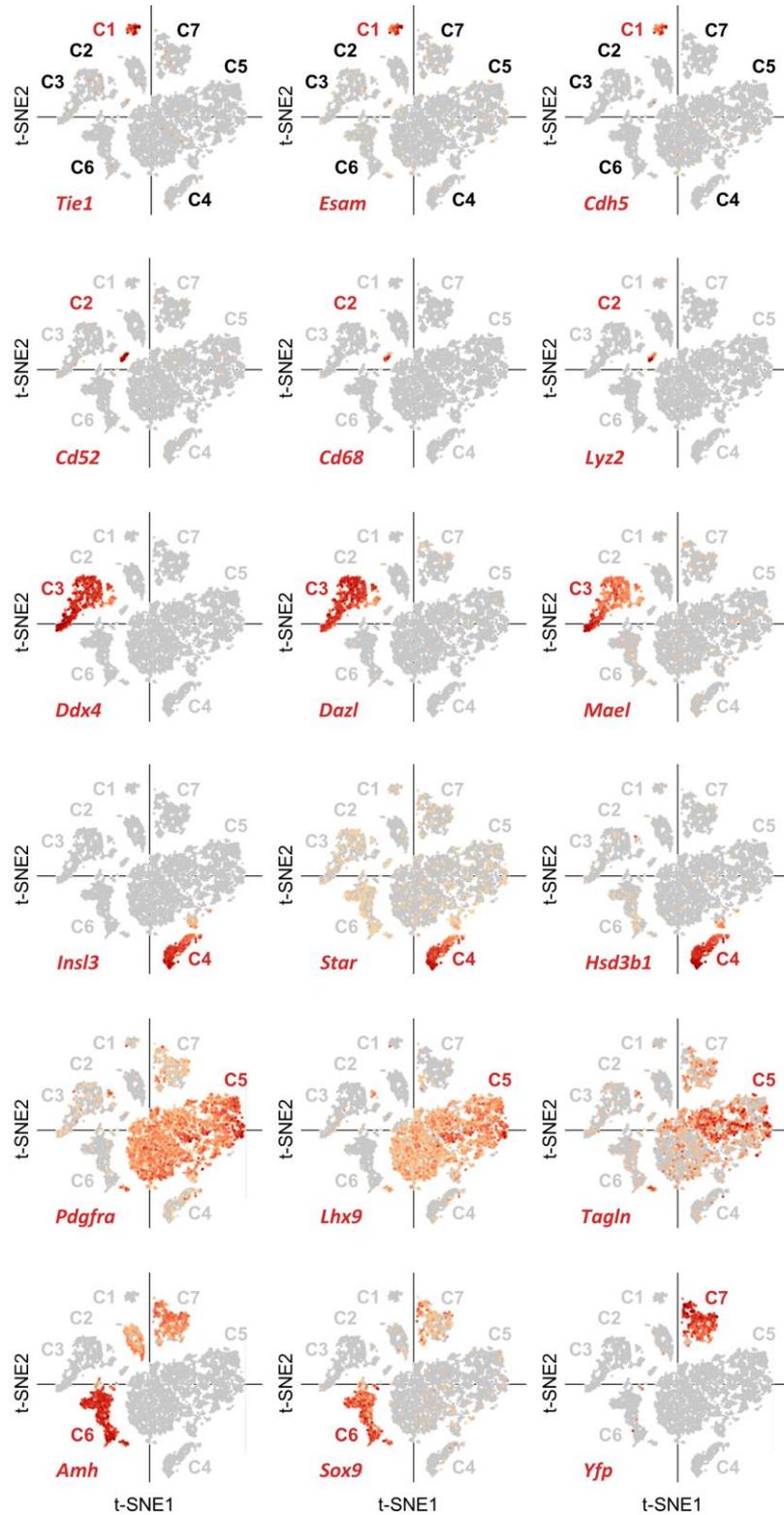
Gene	Accession number	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon size (bp)
<i>Arh</i>	NM_007445.3	5'-TCCTACATCTGGCTGAAGTGATATG-3'	5'-CAGGTGGAGGCTCTTGGAACT-3'	66
<i>Col6a6</i>	NM_001102607.1	5'-TGATTGCGTTCAGCAACGTG-3'	5'-TCCGGCTTGCATAGATCATAG-3'	157
<i>Cyp26b1</i>	NM_001177713.1	5'-CGACATCCACCAGCAACAAG-3'	5'-GGCCTCCTGATATACATTGATGG-3'	151
<i>Dhh</i>	NM_007857.5	5'-GCACAGGATTCACTCCACTACGA-3'	5'-CCAGTGAGTTATCAGCTTTGACC-3'	172
<i>Fst</i>	NM_001301373.1	5'-CTGGCTACTCTGCCAGTT-3'	5'-ACATCCTCCTCGGTCCATGA-3'	167
<i>Hsd17b3</i>	NM_008291.3	5'-ATGGAGTCAAGGAGGAAAGGC-3'	5'-ATGGAGTCAAGGAGGAAAGGC-3'	76
<i>Inhbb</i>	NM_008381.4	5'-GCGTCTCCGAGATCATCAGC-3'	5'-CACCTTGACCCGTACCTTCC-3'	188
<i>Itga6</i>	NM_001277970.1	5'-GCCGCTACTTTCAC TAAGGACT-3'	5'-TTCTTTTGTTCACACGGACGA-3'	92
<i>Pcp4</i>	NM_008791.3	5'-GCCACCAACGAAAAGACAA-3'	5'-TTCAGGTGGACCAGGAAGCA-3'	194
<i>Ptgsd</i>	NM_008963.3	5'-GCTCTTCGCATGCTGTGGAT-3'	5'-GCCCCAGGAAC TTGTCTTGTT-3'	118
<i>Sox8</i>	NM_011447.3	5'-ACCCGCATCTCCATAACGCA-3'	5'-TGGTGGCCCAAGTTCAGTACC-3'	214
<i>Sox9</i>	NM_011448.4	5'-CAGCAAAGACTCTGGGCAAG-3'	5'-TCCACGAAGGGTCTCTTCTC-3'	63
<i>Tubb3</i>	NM_023279.3	5'-CGTGAAGTCAGCATGAGGGA-3'	5'-TCCAAGTCCACCAGAATGGC-3'	218



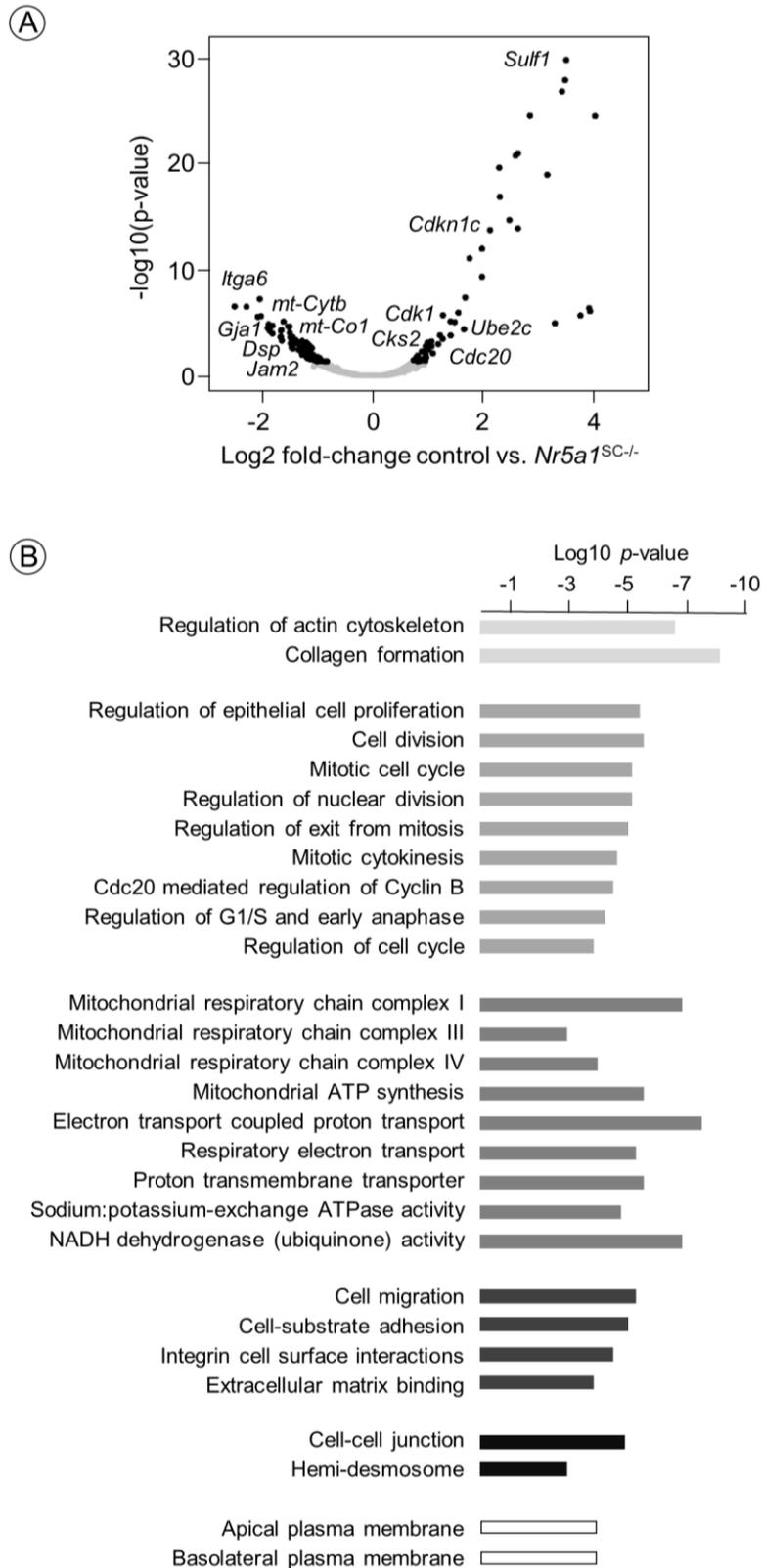
Supplementary Figure 1. Germ cells prematurely initiate meiosis and die in *Nr5a1*^{SC-/-} mutants. (A-H) Detection of DDX4, STRA8, REC8, H2AFX (red signals) and AMH (green cytoplasmic signals) on histological sections of control (A-D) and *Nr5a1*^{SC-/-} mutant (E-H) testes at E15.5. Arrows point to germ cells. The meiotic proteins STRA8, REC8, H2AFX are readily detected in the mutant but are absent in the control testes. Scale bar (in H): 50 μ m (A-H).



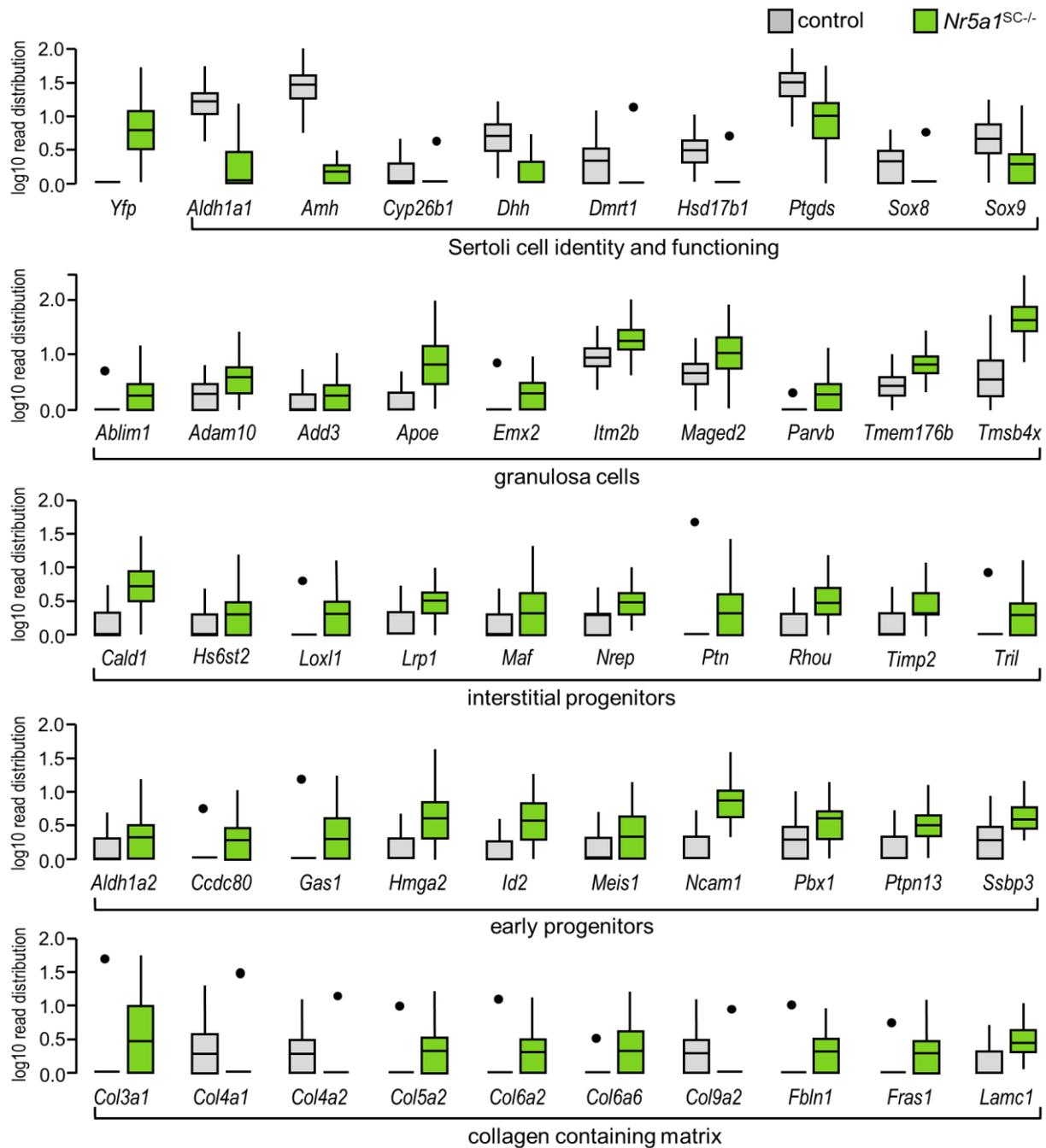
Supplementary Figure 2. Ablation of *Nr5a1* in Sertoli cells impairs SOX8 and SOX10 expression. (A-F) Detection of WT1, SOX8, SOX10 (red signals) and AMH (green signals) on transverse histological sections of the testis of a control (A-C) and a *Nr5a1*^{SC-/-} mutant foetus (D-F) at E13.5. Nuclei are counterstained with DAPI (blue signal). Scale bar (in F): 30 μ m (A-F).



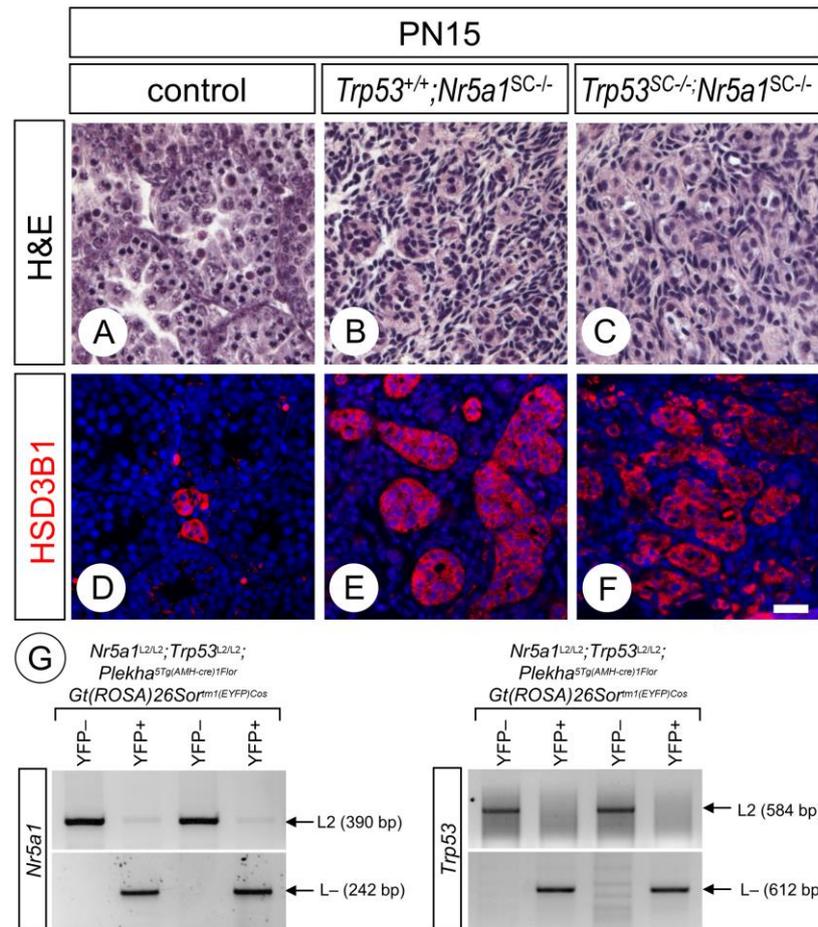
Supplementary Figure 3. Identification of cell clusters generated from the single-cell transcriptomes. Gene expression patterns of selected genes specific of each cell-type projected on t-SNE plots. *Tie1*, *Esam* and *Cdh5* identify endothelial cells (cluster C1); *Cd52*, *Cd68* and *Lyz2* identify macrophages (cluster C2); *Ddx4*, *Dazl* and *Mael* identify germ cells (cluster C3); *Insl3*, *Star* and *Hsd3b1* identify Leydig cells (cluster C4); *Pdgfra*, *Lhx9* and *Tagln* identify interstitial and peritubular myoid cells; *Amh* and *Sox9* identify control Sertoli cells (clusters C6a and C6b); *Yfp* identifies *Nr5a1*-null mutant Sertoli cells (Cluster C7).



Supplementary Figure 4. Cluster C6a contains mitotic Sertoli cells. (A) Volcano plot of differential gene expression in Sertoli cells isolated from control testes and contained in clusters C6a and C6b. Black dots correspond to genes deregulated more than 1.2-fold. **(B)** Enriched GO terms and *p*-values obtained for genes differentially expressed between clusters C6a and C6b. GO terms are grouped by processes.



Supplementary Figure 5. NR5A1-deficient Sertoli change their identity. Tukey box plots illustrating medians, ranges and variabilities of log₂ expression of the indicated genes.



Supplementary Figure 6. The testis of *Nr5a1*^{SC-/-} mutants at PN15 lacks seminiferous cords, irrespective of the presence or absence of TRP53 is present in Sertoli cells. (A-F) Haematoxylin and eosin staining (H&E), and detection of HSD3B1 (red signals) on transverse histological sections of testes from control (A), *Nr5a1*^{SC-/-} (B) and *Nr5a1*^{SC-/-};*Trp53*^{SC-/-} mutants at PN15. In (D-F) nuclei are counterstained with DAPI (blue signal). Scale bar (in F): 30 μ m (A-F). **(G)** PCR analysis of genomic DNA extracted from FACS-purified YFP-positive (YFP+) and negative (YFP-) cells contained in *Nr5a1*^{SC-/-};*Trp53*^{SC-/-} mutants fetuses at E14.5. Left panel shows genotyping of *Nr5a1* alleles; right panel shows genotyping of *Trp53* alleles. The YFP-negative cells (i.e., all cells except Sertoli cells) contain only the unexcised (L2) alleles, while the YFP-positive cells (i.e., Sertoli cells) contain only the cre-recombined, null (L-) alleles. Note however that traces of the *Nr5a1* L2 alleles are detected in YFP-positive cells.

Chapitre V

Discussion

Chapitre V : Discussion

1. Ablation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli

Dans le but d'invalider *Nr5a1* uniquement dans les cellules de Sertoli (CS) durant le développement embryonnaire, j'ai généré un modèle murin à l'aide des souris transgéniques *Plekha5Tg^(AMH-cre)1^{Flor}* (Lécureuil et al., 2002). Chez cette souris, la recombinaison Cre s'exprime sous le contrôle du promoteur de *Amh*, donc spécifiquement dans les CS. Chez le mâle, *Amh* est exprimé par les CS à partir de 12,50jpc. Par contre, d'après plusieurs études, la recombinaison Cre *Plekha5Tg^(AMH-cre)1^{Flor}* ne commence à être efficace qu'entre 14,50jpc et 15,50jpc dans un fond génétique C57BL/6 (Lécureuil et al., 2002 ; Gao et al., 2006 ; Moniot et al., 2009). Dans notre étude, l'inactivation de *Nr5a1* dans le fond génétique mixte C57BL/6-129/Sv (50–50%) se produit un jour plus tôt, à 13,50jpc (**Chapitre 4, Figure 1**). La différence de fond génétique utilisé peut expliquer que *Plekha5Tg^(AMH-cre)1^{Flor}* est efficace un jour avant dans notre étude.

De plus, afin de pouvoir tracer le devenir des CS invalidées, j'ai intégré un rapporteur fluorescent à notre modèle, *Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos* (Srinivas et al., 2001). Ainsi, les cellules ayant subi l'excision par la recombinaison Cre expriment la protéine fluorescente YFP (yellow fluorescent protein) que l'on est capable de détecter par immunohistochimie (IHC). Dans notre étude, de manière surprenante, YFP est détectée à partir de 12,50jpc, soit un jour avant l'inactivation de *Nr5a1*. Pour expliquer ce résultat, plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Premièrement, la demi-vie de NR5A1 dans les CS n'est pas connue. Néanmoins, des modélisations *in silico* en fonction de la séquence protéique de NR5A1 prédisent un temps de demi-vie de 30 heures environ (calculé à partir de base de données en ligne ExPASy). On peut donc imaginer qu'il est normal de détecter NR5A1 à 13,50jpc si la demi-vie de NR5A1 est supérieure à 24 heures.

- Deuxièmement, il existe un phénomène appelé « recombinaison non parallèle ». Ce phénomène décrit le fait que plusieurs allèles floxés peuvent avoir une sensibilité différente à la recombinaison Cre. Ainsi, dans des modèles porteurs à la fois d'un allèle floxé et d'un rapporteur fluorescent floxé, il arrive que la recombinaison Cre possède une meilleure efficacité pour l'un des allèles. Cette efficacité différentielle dépend de plusieurs critères, à savoir (i) la distance entre les deux sites *loxP* entourant l'allèle à invalider, (ii) la localisation des sites *loxP*

sur le génome, l'environnement épigénétique des séquences entourant les sites *loxP* et enfin (iii) le niveau d'expression de la recombinaise Cre (Liu et al., 2013). Dans notre cas, la distance entre les sites *loxP* situés sur *Nr5a1* et sur le rapporteur fluorescent est équivalente. En revanche, il est possible que la portion de chromatine sur laquelle se situent les sites *loxP* encadrant *Nr5a1* soit moins accessible pour la recombinaise Cre que pour la portion de chromosome sur lequel se trouve le rapporteur fluorescent.

En conséquence, il est possible que le délai que nous observons entre l'expression du rapporteur fluorescent et l'inactivation de *Nr5a1* soit causé par l'un de ces facteurs ou plusieurs d'entre eux en même temps. Malgré les délais de recombinaison, rien ne laisse penser que les expressions de la recombinaise Cre ou du rapporteur fluorescent sont aspécifiques. En effet, la détection de YFP par IHC révèle une localisation similaire à celle de AMH, c'est-à-dire dans des CS (Srinivas et al., 2001 ; Lécureuil et al., 2002). De plus, *Nr5a1* continue d'être exprimé normalement dans les cellules de Leydig (CL). En conclusion, grâce à l'utilisation du transgène *Plekha5Tg^(AMH-cre)1^{Flor}*, *Nr5a1* est totalement invalidé uniquement dans les CS après la différenciation sexuelle et sans provoquer de létalité chez les animaux mutants.

2. Perte de la fonction Sertolienne

L'identité et la fonction sertoliennes sont maintenues grâce à un réseau génique interdépendant faisant intervenir de nombreux acteurs, parfois impliqués dans des boucles de régulation mutuelle. L'expression de *Sox9*, qui est l'acteur central de la voie de différenciation masculine, est fortement et rapidement diminuée après l'inactivation de *Nr5a1*. Il a été montré que NR5A1 et SRY permettent l'initiation de l'expression de *Sox9* durant la différenciation sexuelle. Le maintien de l'expression de *Sox9* fait ensuite intervenir SOX9 lui-même et NR5A1 (Sekido and Lovell-Badge, 2008). Notre étude confirme que le maintien de l'expression de *Sox9* n'est plus possible en l'absence de NR5A1. De plus, NR5A1 et SOX9 sont capables d'induire l'expression de *Amh* dont l'expression aussi est diminuée dans les CS invalidées pour *Nr5a1* (**Chapitre 4, Figure 3**) (Shen et al., 1994 ; Giuili et al., 1997 ; De Santa Barbara et al., 1998 ; Arango et al., 1999). L'expression de plusieurs autres gènes de l'identité sertolienne est aussi fortement réduite, comme par exemple celle de *Ptgds*, *Dmrt1*, *Dhh*, *Cyp26b1*, *Inhbb*, *Hsd17b3*, *Tmem184a* et *Aldh1a1* (**Chapitre 4, Figures 3 et 5**). Par ailleurs, *Ptgds* et *Sox9* sont impliqués dans une boucle de régulation qui permet le maintien mutuel de leur expression et la localisation nucléaire de SOX9, grâce à la production de PGD2 par PTGDS. La localisation

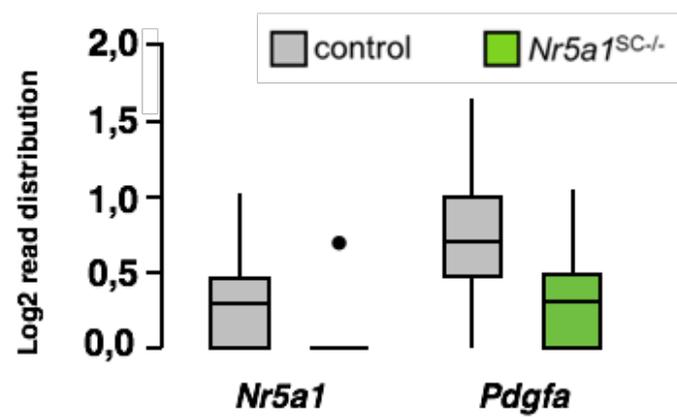


Figure 34 : Baisse de l'expression de *Pdgfa* dans les cellules de Sertoli invalidées pour *Nr5a1*
 Graphique en boîtes à moustaches illustrant l'expression log₂ de *Nr5a1* et *Pdgfa* dans les cellules de Sertoli contrôles et invalidées pour *Nr5a1*.

cytoplasmique de SOX9 observée à 14,50jpc est donc vraisemblablement une conséquence de la réduction de l'expression de *Ptgds* et la diminution de la production de PGD2 qui en résulte (**Chapitre 4, Figure 3**) (Wilhelm et al., 2007 ; Moniot et al., 2009).

Il est admis que les CS jouent un rôle dans central l'organisation de l'architecture du testicule fœtal et adulte. Nous observons des défauts d'intégrité de la lame basale chez les animaux *Nr5a1^{SC-/-}* (**Chapitre 4 Figure 4**). Par ailleurs, les endroits de rupture dans la lame basale sont corrélés avec la perte d'expression de SOX9 dans les CS. Des études ont montré l'importance de *Sox9* et de *Sox8* dans le maintien de l'intégrité de la lame basale. En effet, *Sox9* est capable d'activer l'expression de *Col4a1* et *Col4a2*, deux composants du collagène de type 4 qui constituent la membrane basale (**Chapitre 4, Figures 1 et 4**)(Sumi et al., 2007 ; Chen et al., 2013). D'ailleurs, lors de l'invalidation de *Ptgds*, qui conduit elle aussi à une diminution de l'expression de *Sox9*, on observe des défauts transitoires d'organisation des cordons séminifères et notamment de la lame basale (Moniot et al., 2009).

La formation des cordons séminifères ne dépend pas seulement des CS, mais aussi des cellules endothéliales et des cellules myoïdes périvitubulaires. A partir de 11,50jpc, les cellules endothéliales migrent du mésonephros adjacent à la gonade fœtale pour participer à la formation du système vasculaire du testicule (Combes et al., 2009). Pour aboutir à une vascularisation optimale, les cellules endothéliales ont besoin de signaux provenant des CS. Par exemple, *Inhbb* et *Pdgfra*, le récepteur de *Pdgfa*, sont exprimés par les CS. Les invalidations respectives de *Inhbb* ou de *Pdgfra* ont montré leur implication dans la migration des cellules endothéliales et dans la vascularisation de la gonade (Brennan et al., 2003 ; Yao et al., 2006 ; Cool et al., 2012). Ces études ont montré que les défauts de vascularisation entraînent l'absence de formation des cordons séminifères, démontrant l'importance des cellules endothéliales dans la mise en place de l'architecture testiculaire. Dans notre étude, les CS invalidées pour *Nr5a1* présentent une diminution de l'expression d'*Inhbb* et *Pdgfa* (**Figure 34**) (**Chapitre 4 Figure 5**), mais les profils transcriptomiques des cellules endothéliales ne semblent pas affectés par ces diminutions (**Chapitre 4 Table S1**). Des études supplémentaires seront nécessaires pour savoir si l'invalidation de *Nr5a1* dans les CS a un effet sur la mise en place de la vascularisation par les cellules endothéliales et par conséquent sur l'architecture des cordons séminifères.

Les cellules myoïdes périvitubulaires (CMP) sont, quant à elles, impliquées dans la formation de la lame basale. Les CMP expriment à leur surface le récepteur PTCH1 alors que son ligand DHH est produit par les CS. L'invalidation de *Dhh* provoque l'absence de lame basale et une désorganisation des cordons séminifères (Clark et al., 2000 ; Pierucci-Alves et al., 2001). Les profils transcriptomiques des CMP présentes chez les mutants *Nr5a1^{SC-/-}* montrent que ces

cellules perdent uniquement l'expression de *Ptch1*. Le fait que l'expression des gènes impliqués dans la formation de la lame basale n'est pas affectée malgré la perte d'expression de *Dhh* par les CS démontre que la fonction globale des CMP n'est pas altérée (**Chapitre 4, Table S1**).

On peut donc conclure que l'expression de *Pdgfa*, *Inhbb* et *Dhh* par les CS au-delà de 13,50jpc n'est pas nécessaire pour permettre l'émergence et le maintien des cellules endothéliales et des CMP. Plus globalement, l'absence de *Nr5a1* et la dérégulation qu'elle entraîne sur l'expression de la plupart des gènes nécessaires à la fonction des CS est sûrement la cause de la désorganisation des cordons séminifères que nous observons dès 14,50jpc (**Chapitre 4, Figures 1 et 4**).

3. Quel avenir pour les cellules germinales sans cellules de Sertoli fonctionnelles ?

Chez le mâle, les CG arrêtent progressivement de proliférer entre 12,50jpc et 14,50jpc pour entrer en quiescence mitotique et le rester jusqu'à la naissance (Western et al., 2008). La destinée masculine des CG est régulée par des facteurs produits par les CS comme FGF9, CYP26B1 et PTGDS, mais aussi par l'expression de gènes comme *Nanos2* par les CG elles-mêmes (Suzuki and Saga, 2008 ; MacLean et al., 2007 ; Bowles et al., 2010 ; Moniot et al., 2014). Ces facteurs ont pour but d'empêcher l'entrée en méiose prématurée des CG, notamment en régulant l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ou en rendant les CG incapables d'exprimer *Stra8*. Dans notre étude, les CG entrent en méiose rapidement après l'inactivation de *Nr5a1* dans les CS, dès 14,50jpc, puis meurent par apoptose (**Chapitre 4, Figures 2 et 7 ; Supplementary Figure 1**). Il a été montré dans plusieurs modèles que lorsque les CG entrent en méiose prématurément chez le mâle, celles-ci meurent rapidement (MacLean et al., 2007 ; Tsuda et al., 2003).

Grâce à nos résultats transcriptomiques et de RT-qPCR, nous observons une diminution de l'expression de *Nanos2*, *Cyp26b1* et *Ptgds* (**Chapitre 4, Figure 3 et 5 ; Supplementary Figure 5**). La diminution de l'expression de *Cyp26b1* était attendue car son expression est régulée de manière additive par SOX9 et NR5A1 (Kashimada et al., 2011). Par ailleurs, de nombreuses études décrivent CYP26B1 comme jouant le rôle de substance inhibitrice de la méiose (Koubova et al., 2006). L'une des hypothèses défendues est que CYP26B1 dégrade l'acide rétinoïque présent dans la gonade fœtale masculine. L'acide rétinoïque joue, quant à lui, le rôle de molécule responsable de l'initiation de la méiose car il induit l'expression de son gène

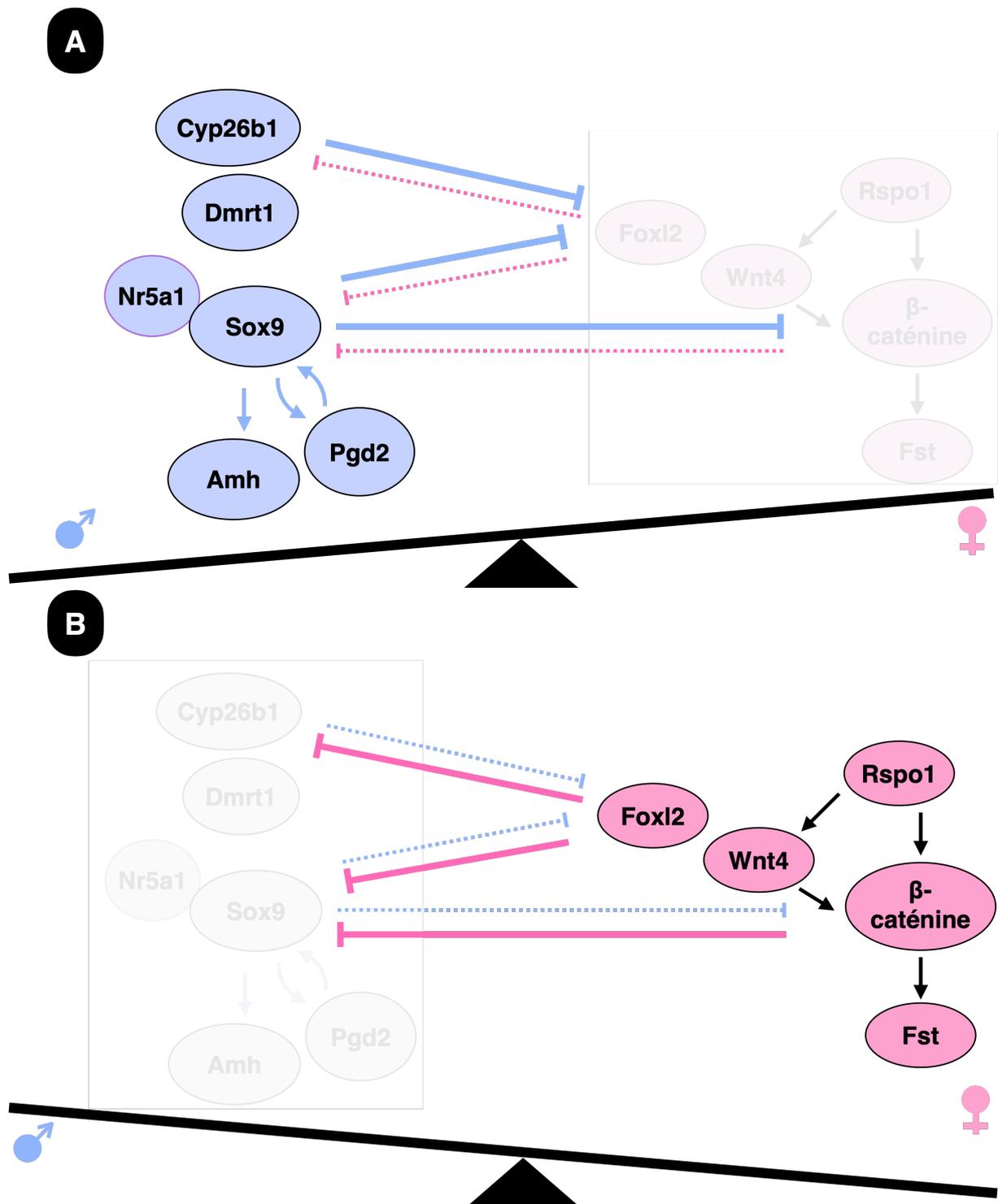


Figure 35 : Déséquilibre des voies de signalisation antagonistes mâle et femelle

(A) En situation normale chez le mâle, les gènes sertoliens permettent de maintenir l'identité sexuelle en entretenant une relation d'antagonisme avec les gènes impliqués dans le développement des cellules de la granulosa.

(B) L'inactivation de *Nr5a1* a provoqué un déséquilibre entre les voies de différenciation mâle et femelle. L'expression des gènes caractéristiques des cellules de la granulosa n'est plus inhibée. Les cellules de Sertoli se différencient en cellule de la granulosa.

Adapté de (She and Yang, 2017)

cible *Stra8* (Baltus et al., 2006). Dans la gonade masculine, les CS constituent la principale source d'acide rétinoïque grâce à l'expression de *ALDH1A1* (Bowles et al., 2016). Nos résultats indiquent clairement que les CG entrent en méiose, et ce malgré la perte flagrante de *ALDH1A1* dans les CS des mutants *Nr5a1^{SC-/-}*, questionnant ainsi l'origine de l'acide rétinoïque si celui-ci est impliqué l'entrée en méiose des CG (**Chapitre 4, Figure 5 ; Supplementary Figure 5**). Nos observations sont davantage compatibles avec les résultats publiés récemment par mon équipe et par celle de Marie-Christine Chaboissier selon lesquels, l'acide rétinoïque n'est pas « la » molécule nécessaire pour permettre l'initiation de la méiose (Chassot et al., 2020 ; Vernet et al., 2020). Ils sont aussi en accord avec les résultats publiés par les équipes de Gabriel Livera et de Greg Duester, montrant que *CYP26B1* est bien nécessaire pour prémunir les CG de l'entrée en méiose (Kumar et al., 2011; Bellutti et al., 2019).

Quoi qu'il en soit, nous confirmons ici que les CS sont les garantes du destin des CG. En l'absence de CS fonctionnelles et exprimant *Cyp26b1*, les CG ne peuvent pas maintenir leur état de quiescence mitotique et entrent en méiose prématurément pour disparaître par apoptose peu de temps après.

4. Le changement d'identité des cellules de Sertoli en l'absence de *Nr5a1*

Après avoir constaté que l'inactivation de *Nr5a1* induit des modifications drastiques de l'expression des gènes spécifiques des CS et une désorganisation complète de l'architecture de la gonade, nous avons voulu savoir quels sont les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces altérations et déterminer la destinée des CS mutantes. Pour cela, nous avons réalisé un séquençage de l'ARN sur cellule unique à partir de gonade foetale à 14,50jpc, soit un jour après l'inactivation de *Nr5a1*, mais avant la disparition des CS (**Chapitre 4, Figures 1 et 7 ; Supplementary Figure 2**). En procédant de la sorte, nous avons obtenu les profils transcriptomiques de toutes les cellules composant les gonades contrôles et *Nr5a1^{SC-/-}*. Nous nous sommes d'abord intéressés à la liste des gènes différentiellement exprimés entre des CS contrôles et invalidées pour *Nr5a1*. Ces listes de gènes ont été comparées aux listes de gènes qui caractérisent chacun des types cellulaires de la gonade embryonnaire mâle et femelle (Stévant et al., 2018 ; Stévant et al., 2019).

En plus de leur rôle dans le développement de la gonade masculine, certains des gènes sertoliens sont aussi impliqués dans le maintien de l'identité sexuelle. En effet, la relation d'antagonisme mutuel qu'ont certains gènes sexuellement dimorphiques permet de maintenir

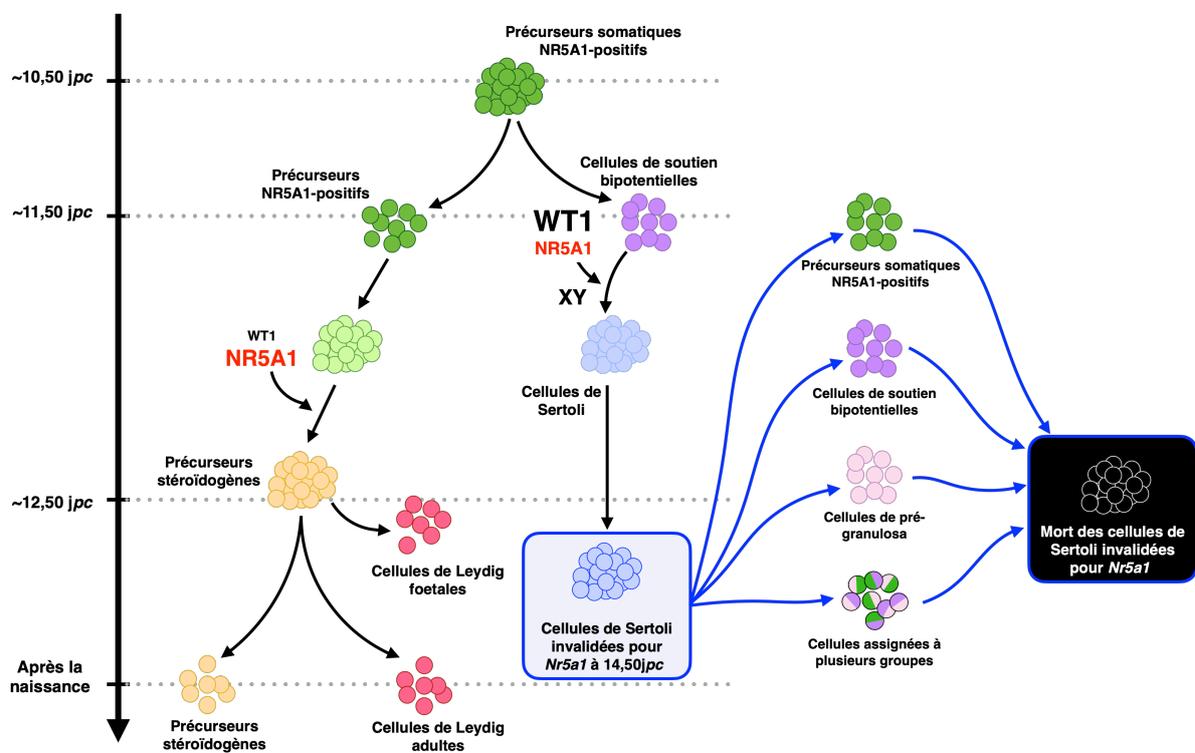


Figure 36 : Le retour à un état précoce des cellules de Sertoli invalidée pour *Nr5a1*

En l'absence de *Nr5a1* une partie des cellules de Sertoli commence à exprimer des gènes spécifiques des cellules de granulosa foetale (13,2% des cellules). Les cellules de Sertoli invalidées expriment aussi des gènes spécifiques des précurseurs somatiques précoces (1,6% des cellules) et des précurseurs interstitiels précoces (5,8%). Un autre groupe de cellules de Sertoli invalidées exprime des gènes caractéristiques de plus d'un type cellulaire (5,1% des cellules). La grande majorité des cellules de Sertoli invalidées n'a pas pu être assignée à un type cellulaire (74,3% des cellules).

Globalement les CS invalidées pour *Nr5a1* présentent un état de différenciation plus précoce.

Adapté de (Stévant and Nef, 2019)

l'identité sexuelle des ovaires et des testicules. Par exemple, il a été montré que *Sox9* empêche l'expression de *Rspo1*, *Wnt4* et *Foxl2* (Chaboissier et al., 2004b ; Maatouk et al., 2008). De manière semblable, *Dmrt1* et *Foxl2* ont une relation d'antagonisme mutuel pour l'expression de *Cyp26b1* (Matson et al., 2011 ; Park et al., 2010 ; Kashimada et al., 2011). Nous avons constaté que 15% des gènes surexprimés par les CS invalidées pour *Nr5a1* sont caractéristiques des cellules de la granulosa (**Chapitre 4, Figure 6 et 7**). Par exemple, les niveaux d'ARNm des gènes *Fst*, *Foxl2*, *Rspo1* et *Wnt4* sont augmentés (**Chapitre 4, Figure 5 ; Supplementary Figure 5**). Cette augmentation peut être provoquée par la diminution de l'expression des gènes sertoliens impliqués dans la relation d'antagonisme avec les gènes caractéristiques des cellules de la granulosa, comme *Nr5a1*, *Sox9*, *Sox8* et *Dmrt1*. L'invalidation de *Nr5a1* a donc induit la réduction de l'expression des gènes sertoliens connus pour inhiber l'expression des gènes impliqués dans le développement ovarien. Ce déséquilibre de la relation d'antagonisme mutuel entre les voies de différenciation masculines et féminines provoque la *trans*-différenciation des CS en cellules ressemblant à des cellules de la granulosa (**Figure 35**).

La suite de cette analyse a produit des résultats surprenants. En effet, 18% et 20% des gènes dont l'expression est augmentée dans les CS invalidées pour *Nr5a1* sont des marqueurs caractéristiques des précurseurs somatiques précoces et des précurseurs interstitiels précoces de la gonade masculine fœtale. De plus, des analyses de trajectoire ont montré que les CS invalidées pour *Nr5a1* présentent un état de différenciation globale plus précoce que les CS contrôles (**Chapitre 4, Figure 6**). Les mécanismes qui conduisent à ce résultat inattendu restent encore difficiles à décrypter. Néanmoins, l'implication de *Nr5a1* dans des processus de différenciation des CS est bien décrite. En effet, lors de l'invalidation de *Wtl* dans les CS, on constate l'apparition de cellules HSD3B1-positives, qui est un marqueur spécifique des CL. Dans ce modèle, l'invalidation de *Wtl* provoque la hausse de l'expression de *Nr5a1* qui conduit les CS à se différencier en CL stéroïdogènes (Chen et al., 2017). De plus, la reprogrammation *in vitro* de fibroblastes en CS nécessite 5 facteurs qui sont *Nr5a1*, *Gata4*, *Wtl*, *Dmrt1* et *Sox9*. Ce processus de reprogrammation se fait en plusieurs étapes mais lors de chacune d'elle, *Nr5a1* est indispensable (Buganim et al., 2012). D'ailleurs, *Gata4* et *Nr5a1* sont suffisants pour la reprogrammation de fibroblastes humains en CS (Liang et al., 2019). Ces études montrent que l'identité Sertolienne est indissociable de l'expression de *Nr5a1*. Nos résultats laissent penser que *Nr5a1* ou un gène régulé par *Nr5a1* agit comme un verrou empêchant les CS de retrouver un état de différenciation plus précoce (**Figure 36**).

Parce que les CS invalidées pour *Nr5a1* expriment des marqueurs caractéristiques des précurseurs interstitiels précoces, nous avons envisagé la possibilité qu'elles se soient

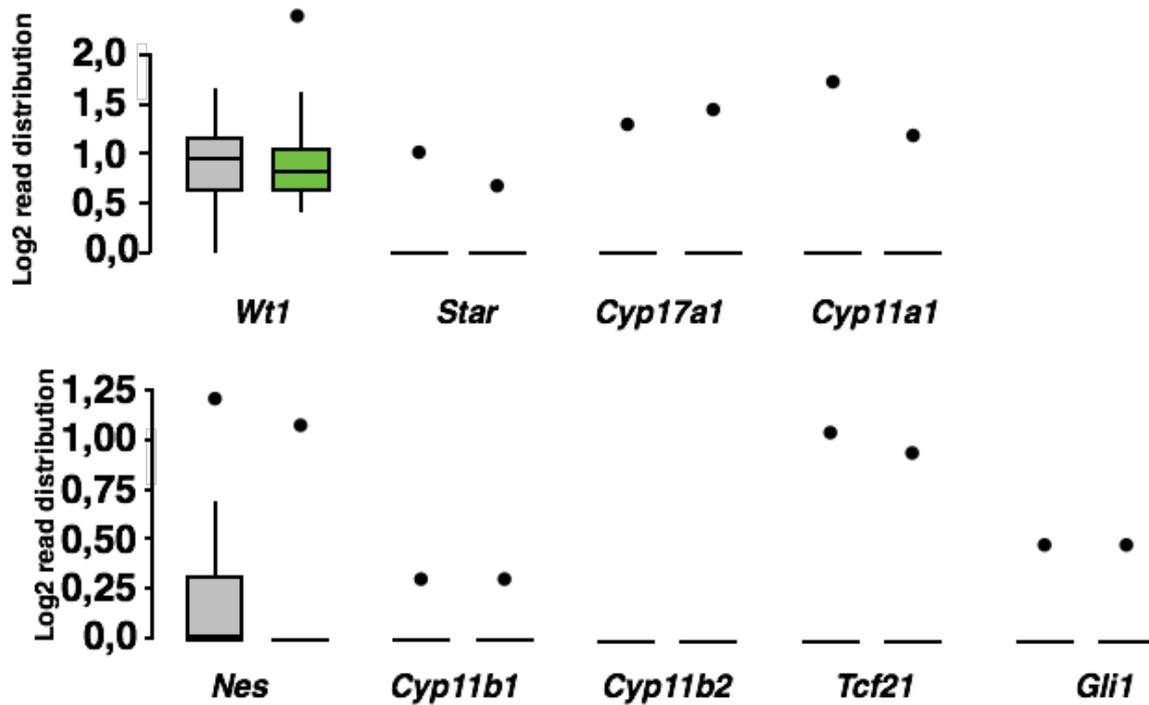


Figure 37 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse après l'inactivation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli

Graphique en boîtes à moustaches illustrant l'expression log2 des gènes indiqués dans les cellules de Sertoli contrôles et invalidées pour *Nr5a1*.

différenciées en précurseurs stéroïdogènes. Nous avons testé cette hypothèse en regardant l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse ou dans la différenciation des précurseurs des cellules des glandes corticosurrénales et des précurseurs de CL (**Figure 37**). Nous avons constaté qu'il n'y a pas de modification du niveau de l'expression des gènes *Tcf21*, *Gli1* et *Nes* caractéristiques des précurseurs des glandes corticosurrénales ou des CL (Bandiera et al., 2013; Inoue et al., 2016). De la même manière, on ne constate pas de différence d'expression des gènes *Star*, *Cyp17a1*, *Cyp11a1*, *Cyp11b1*, et *Cyp11b2* impliqués dans la stéroïdogénèse (Morohashi et al., 2013). Enfin, d'après la littérature, *Wtl* agit comme un verrou empêchant la différenciation des précurseurs en cellules stéroïdogènes (Bandiera et al., 2013 ; Chen et al., 2017). L'expression de *Wtl* n'est pas réduite chez les mutants *Nr5a1^{SC-/-}*, ce qui rend logiquement impossible la dédifférenciation des CS invalidées pour *Nr5a1* en cellules stéroïdogènes.

Nous nous sommes ensuite demandé si les CS invalidées pour *Nr5a1* qui présentent des signatures géniques de précurseurs précoces, ou de cellule de la granulosa, sont les mêmes, ou bien si ces destins sont incompatibles entre eux. Pour cela, 12 gènes caractéristiques de chaque identité ont été choisis. Selon ces critères de sélection par expression simultanée des 12 gènes, il s'avère que 13,2% des CS invalidées pour *Nr5a1* sont identifiées comme étant similaires à des cellules de la granulosa foétale, 5,8% comme étant similaires à des précurseurs somatiques précoces, et 1,6% comme étant similaires à des précurseurs interstitiels précoces, indiquant donc des destins bien séparés. Néanmoins, 5,1% des CS invalidées pour *Nr5a1* expriment simultanément des gènes caractéristiques de plusieurs de ces types cellulaires (**Chapitre 4, Figure 6**). Ce résultat nous indique que la dédifférenciation des CS à un état plus précoce ou leur *trans*-différenciation en cellule de la granulosa ne sont pas des événements mutuellement exclusifs.

5. Les causes de la disparition des cellules de Sertoli

Nous avons aussi cherché à comprendre la cause de la disparition des CS chez les animaux mutants *Nr5a1^{SC-/-}*. Nous avons montré grâce, à des expériences d'incorporation de Brdu et à la technique de TUNEL (terminal deoxy-nucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling), que les CS invalidées pour *Nr5a1* cessent de proliférer et meurent (**Chapitre 4, Figures 2 et 7**).

Récemment, l'équipe de Pancharatnam Jeyasuria a étudié un autre modèle murin qu'ils décrivent comme invalidé pour *Nr5a1* dans les CS à partir de 14,50jpc. Cependant, il est

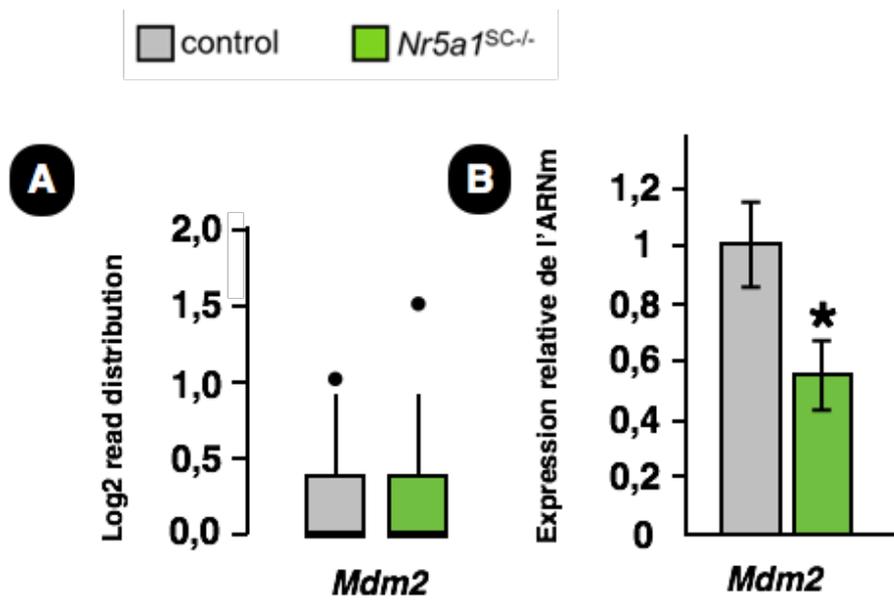


Figure 38 : Niveau d'expression de *Mdm2* après l'inactivation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli

(A) Graphique en boîtes à moustaches illustrant l'expression log2 de *Mdm2* dans les cellules de Sertoli contrôles et invalidées pour *Nr5a1*.

(B) Comparaison des niveaux d'expression de *Mdm2* par RT-qpcr sur 5 gonades entières à 14,50jpc issues d'animaux contrôles et mutants.

important de noter qu'ils détectent NR5A1 à 15,5jpc dans une grande partie des CS. Ils constatent une perte des CS qu'ils imputent à la baisse de l'expression de *Mdm2* qui provoque la mort des CS par un mécanisme dépendant de la phosphorylation de TRP53 (Anamthathmakula et al., 2019). Pour tester si cette hypothèse s'applique à notre modèle, j'ai invalidé *Trp53* dans les CS déjà invalidées pour *Nr5a1*. Le phénotype de ces animaux est en tout point similaire à celui des mutants invalidés pour *Nr5a1* uniquement (**Chapitre 4, Figures 7 ; Supplementary Figure 6**). Ces données permettent d'exclure l'implication de TRP53 dans la disparition des CS. Dans le modèle de Pancharatnam Jeyasuria, la diminution de l'expression de MDM2 et l'augmentation de la présence de la forme phosphorylée de TRP53 sont étudiées par Western-blot, sur des extraits protéiques issus de gonades entières à 15,00jpc. Il est possible que la diminution de MDM2 soit en fait causée par la disparition des CS. Pour preuve, lorsque nous avons réalisé des RT-qPCR sur des gonades mutantes entières à 14,50jpc nous avons aussi constaté une diminution de l'expression de *Mdm2*. Néanmoins, grâce aux données du transcriptome, nous avons pu constater que les CS invalidées pour *Nr5a1* et les CS contrôles expriment *Mdm2* à un niveau similaire (**Figure 38**). L'augmentation de la présence de la forme phosphorylée TRP53 peut, quant à elle, trouver son origine dans l'apoptose des CG. D'ailleurs mes analyses par IHC permettent de localiser TRP53 dans les CG mais pas dans les CS, aussi bien chez les animaux contrôles que chez les mutants *Nr5a1*^{sc-/-} (**Chapitre 4, Figure 7**).

Les résultats de l'équipe de Pancharatnam Jeyasuria sont difficiles à appréhender dans la mesure où la recombinaison Cre qu'ils ont utilisée n'a pas permis d'invalider *Nr5a1* dans toutes les CS. Il en résulte que nos deux modèles présentent des phénotypes clairement différents. D'une part, une fraction importante de CS persiste dans leur modèle car ils observent la présence de tubes séminifères tapissés de CS à l'âge adulte. Leurs illustrations ne permettent pas d'identifier formellement des CS comme étant en apoptose. Les cellules TUNEL-positives qu'ils montrent peuvent aussi être des CG, dont on sait qu'elles disparaissent aussi. D'autre part, il n'est pas fait mention nulle part de l'expression de gènes spécifiques de la granulosa, ce qui traduit sans doute que les CS ne perdent pas leur identité sertolienne comme c'est le cas dans notre modèle (Anamthathmakula et al., 2019).

Nous avons essayé de comprendre par quel mécanisme indépendant de TRP53 les CS dépourvues de *Nr5a1* disparaissent en analysant les données du transcriptome. Nous avons constaté qu'une partie des gènes différentiellement exprimés entre des CS contrôles et invalidées pour *Nr5a1* sont impliqués dans la composition de la membrane basale, la communication cellulaire et le cytosquelette (**Chapitre 4, Figure 1**).

Nous constatons par exemple des dérégulations de l'expression de *Gjal* (à la baisse) et *Ncam* (à la hausse), dont les produits sont impliqués dans les jonctions communicantes et les jonctions serrées entre les CS et entre les CS et les CG. Ces observations peuvent être expliquées par la diminution d'expression de *Sox9* et *Sox8* puisque leur invalidation simultanée provoque les mêmes dérégulations (Barrionuevo et al., 2009). De plus, il a été montré que SOX8, SOX9 et NR5A1 sont capables de réguler positivement l'expression de *Gjal* (Li et al., 2014 ; Couture and Martin, 2020). Il est intéressant de noter que l'invalidation simultanée de *Sox9* et *Sox8* ne provoque pas la mort des CS (Barrionuevo et al., 2009). La disparition des CS que nous observons chez les mutants *Nr5a1^{SC-/-}* n'est donc pas causée uniquement par la perte d'expression de *Sox9* et *Sox8*. D'autres mécanismes sont clairement mis en jeu. On constate par exemple une diminution drastique de l'expression de TUBB3, qui est une tubuline spécifique du cytosquelette des CS. La désorganisation du cytosquelette via une dérégulation de l'expression des tubulines n'a jamais été décrite dans le cadre des invalidations de *Sox9* et *Sox8*. On peut aussi supposer qu'une partie de ces dérégulations de l'adhésion, du cytosquelette et de la matrice extracellulaire, sont le résultat du changement d'identité des CS invalidées pour *Nr5a1*. Chaque type cellulaire possède une matrice extracellulaire différente et des intégrines adaptées à cette dernière. Aussi, les jonctions cellulaires que forment des cellules voisines ne sont pas de même type en fonction du type cellulaire auquel elles appartiennent.

Dans le cas des mutants *Nr5a1^{SC-/-}*, on constate aussi des changements très importants de la composition de la matrice extracellulaire et une diminution de l'expression *Itga6* (**Chapitre 4, Figure 5 ; Supplementary Figure 5**). L'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire est en grande partie dépendant des intégrines. En effet, les intégrines sont des récepteurs d'adhésion qui interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire (Frisch and Screaton, 2001 ; Gilmore, 2005). Une dérégulation de la composition de la matrice extracellulaire ou de l'expression des intégrines peut aisément induire la perte de l'ancrage CS à leur matrice extracellulaire. Dans la mesure où les processus d'adhésion et d'interaction dépendant de l'intégrine sont indispensables à la survie des cellules, nous émettons l'hypothèse que la dérégulation de l'architecture, la matrice extracellulaire et les jonctions des CS invalidées pour *Nr5a1* entraînent leur mort par un mécanisme appelé anoïkis ou encore « apoptose induite par le détachement » ou « mort relayée par l'intégrine ». L'anoïkis est un mécanisme qui permet de maintenir l'intégrité des tissus en induisant la mort des cellules qui perdent leur ancrage à la matrice extracellulaire ou qui n'interagissent plus correctement avec leurs cellules voisines. Cela permet d'éviter le déplacement inapproprié de cellules dans un tissu ou empêcher l'échappement de métastases dans les tissus cancéreux (Hofmann et al., 2007). D'autre part, le

fait que les CS dépourvues de *Nr5a1* soient perdues par anoïkis est totalement compatible avec le fait que TRP53 ne soit pas impliqué dans leur disparition (McGill et al., 1997).

Nous pensons aussi que la mort des CS par anoïkis est la raison de l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la régulation positive de l'apoptose et la diminution de l'expression des gènes anti-apoptotiques dans les CS invalidées pour *Nr5a1*.

En conclusion, l'inactivation de *Nr5a1* dans les CS induit des changements importants dans la composition de la matrice extracellulaire, de l'expression des protéines d'adhérences et de structure. Dans ces conditions, les CS ne sont plus capables d'interagir correctement avec les cellules voisines et meurent par anoïkis, indépendamment de la présence de TRP53.

6. Les cellules de Leydig sont-elles impactées par la disparition des cellules de Sertoli ?

Les cellules de Leydig fœtales (CLF) émergent dans la gonade à partir de 12,50jpc, alors que les cellules de Leydig adultes (CLA) apparaissent après la naissance. Les CS ont un rôle essentiel dans l'émergence des CLF, notamment en exprimant des signaux comme *Dhh* et *Pdgfa*. L'abolition de l'expression de ces facteurs engendre des anomalies de différenciation des CLF (Gnessi et al., 2000 ; Yao et al., 2002 ; Brennan et al., 2003). Rapidement après l'inactivation de *Nr5a1* dans les CS, nous observons des diminutions d'expression de *Dhh* et *Pdgfa* (**Figure 34**) (**Chapitre 4 Figure 5**). Cependant, des variations minimales de l'expression des gènes des CLF sont observés chez les animaux *Nr5a1^{SC-/-}*. Seuls les 4 gènes *Smoc2* (SPARC related modular calcium binding 2), *Spats2l* (spermatogenesis associated, serine-rich 2-like), *Htr3a* (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A) et *Gem* (GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)) voient leur expression faiblement (mais significativement) diminuée (**Chapitre 4, Table S1**), sans lien évident avec la fonction des CLF. Ces résultats révèlent que l'expression de *Dhh* et *Pdgfa* par les CS jusqu'à 13,50jpc est suffisante pour faire émerger des CLF fonctionnelles.

Malgré la désorganisation du testicule, les gonades des animaux *Nr5a1^{SC-/-}* contiennent des CL exprimant HSD3B1 aux stades embryonnaires comme à l'âge adulte (**Chapitre 4, Figure 1 ; Supplementary Figure 6**). De plus, ces CLF semblent fonctionnelles car les animaux *Nr5a1^{SC-/-}* ne présentent pas de cryptorchidie. Le phénomène de descente des testicules est dépendant de l'expression de *Ins13* par les CLF (Nef and Parada, 1999) et ce gène est

normalement exprimé chez les mutants *Nr5a1^{SC-/-}* (Table S1). De surcroît, des taux normaux de testostérone sont maintenus chez les mutants, aussi bien à la naissance qu'à l'âge adulte.

Les CLA apparaissent dans le testicule environ 7 jours après la naissance, sous l'influence des CLF et des CS. Dernièrement, plusieurs études ont montré que la présence des CS dans le testicule fœtal est importante pour permettre l'émergence des CLA. La disparition des CS aux stades fœtaux par traitements à la toxine diphtérique ou invalidation de *Mdm2* conduit à des testicules qui ne contiennent que des CLF à l'âge adulte. Les auteurs expliquent ce phénomène par le fait que les précurseurs des CLA sont moins nombreux (Rebourcet et al., 2014 ; Fouchecourt et al., 2016). Les CLF ne se divisent quasiment pas chez les animaux contrôles à 13,50jpc-15,50jpc, tout comme chez mutants *Nr5a1^{SC-/-}* (Miyabayashi et al., 2013). Il n'était donc pas possible de mesurer la prolifération des CLF. Il serait néanmoins intéressant de quantifier les précurseurs des CLA dans notre modèle *Nr5a1^{SC-/-}*, et déterminer ensuite si les CL que nous observons chez l'adulte constituent une population homogène de CLF ou un mélange de CLF et CLA. Pour cela, nous pourrions détecter l'expression de *Hsd3b6* qui est un marqueur spécifique des CLA.

Pour conclure, l'invalidation de *Nr5a1* dans les CS ne semble pas avoir d'impact sur l'émergence, la fonction et la destinée des CLF. Par contre, il nous reste encore à déterminer si en l'absence de CS et de CG l'émergence d'une seconde population de CL, à savoir les CLA, est possible.

7. L'hermaphrodisme des mutants *Nr5a1^{SC-/-}* était-il prévisible ?

Chez le mâle, la régression des canaux de Müller dépend de l'action de AMH qui débute entre 13,50 jpc et 14,50jpc (Gao et al., 2006). L'expression d'*Amh* par les CS est régulée par *Nr5a1* en coopération avec différents cofacteurs (Nachtigal et al., 1998 ; De Santa Barbara et al., 1998 ; Tremblay et al., 2001 ; Schepers et al., 2003 ; Miyamoto et al., 2008 ; Polanco et al., 2009). C'est pourquoi après l'invalidation de *Nr5a1* dans les CS on observe logiquement une forte diminution de l'expression de *Amh*/AMH à partir de 13,50jpc (**Chapitre 4 Figure 3 et Supplementary Figure 1**). La diminution drastique de la production d'AMH qui en résulte provoque tout aussi logiquement la persistance des dérivés des canaux de Müller. Les individus *Nr5a1^{SC-/-}* présentent un utérus raccourci, des cordes utérines bilatérales incomplètes et un vagin.

En plus des organes génitaux féminins, les animaux *Nr5a1^{SC-/-}* possèdent un tractus urogénital mâle. L'appareil urogénital mâle est issu de la différenciation des canaux de Wolff, du sinus urogénital et du tubercule génital qui se développent à différents stades fœtaux, sous l'influence des androgènes et plus particulièrement sous l'influence de la testostérone et de son dérivé la dihydrotestostérone (DHT). Dans notre étude, les souris *Nr5a1^{SC-/-}* âgées de 60 jours présentent un raccourcissement de la distance anogénitale, ainsi que des vésicules séminales dont le poids est plus faible et un os du pénis dont la taille est réduite (**Chapitre 4, Figure 8**). Le fait que les organes génitaux masculins soient formés illustre que les animaux ont été exposés aux androgènes durant le développement fœtal, mais cette exposition semble avoir été insuffisante pour permettre la croissance normale des organes. Il a été démontré qu'il existe une coopération étroite entre les CL et les CS pour la production de testostérone durant la période foetale. Les CLF produisent de l'androstènedione mais pas de testostérone, car elles n'expriment pas l'enzyme HSD17B3 nécessaire à la dernière étape de sa synthèse. L'androstènedione est transformée en testostérone par les CS qui, elles, expriment *Hsd17b3* (O'Shaughnessy et al., 2000 ; Shima et al., 2013). Nos résultats montrent une perte de l'expression de *Hsd17b3* et *Hsd17b1* chez les mutants *Nr5a1^{SC-/-}*, peut-être responsable de leur sous-exposition aux androgènes. Toutefois, de manière surprenante, les dosages de testostérone circulante dans le sérum d'animaux *Nr5a1^{SC-/-}* à la naissance et à 60 jours ne montrent pas de différence significative.

Récemment, il a été montré que l'inactivation de *Hsd17b3* ne provoque pas de diminution des taux de testostérone circulante, ni de défaut de masculinisation des organes génitaux internes et externes, à l'exception d'une faible diminution de la distance anogénitale. Ces résultats laissent penser qu'il existe d'autres hydroxystéroïdes déshydrogénases capables de réaliser la conversion de l'androstènedione en testostérone, et ainsi compenser l'absence de *Hsd17b3*. Il a été montré que *Hsd17b1* et *Hsd17b12* sont aussi capables de réaliser la dernière étape de synthèse de la testostérone. Comme pour *Hsd17b3*, l'inactivation de *Hsd17b1* ne provoque ni défaut de masculinisation des organes génitaux internes et externes, ni diminution des taux de testostérone circulante (Hakkarainen et al., 2018). Par contre, l'étude du rôle de *Hsd17b12* dans le développement du tractus urogénital n'a pas été possible car son inactivation est létale au stade embryonnaire (Bellemare et al., 2010 ; Rantakari et al., 2010).

D'après la littérature, *Hsd17b1* s'exprime comme *Hsd17b3* dans les CS, et *Hsd17b12* s'exprime dans les CL, les CS et les CG. Nos résultats montrent même que *Hsd17b12* s'exprime dans pratiquement tous les types cellulaires de la gonade à 14,50jpc, à savoir les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules interstitielles et péricubulaires, les CL, les CS et les

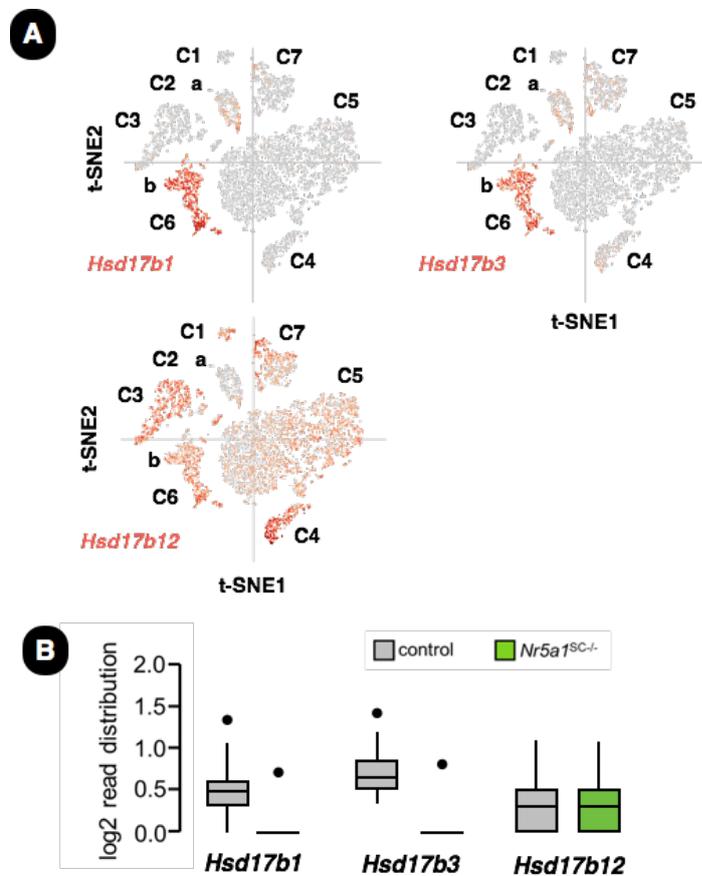


Figure 39 : Identification des types cellulaires exprimant *Hsd17b12*, *Hsd17b3* et *Hsd17b1* à 14,50jpc dans le testicule à partir des données transcriptomiques

(A) Projection de l'expression des gènes sur des graphiques t-SNE. *Hsd17b12* est exprimé dans pratiquement tous les types de cellules qui constitue le testicule à savoir : C1 (les cellules endothéliales), C2 (les macrophages), C3 (cellules germinales), C4 (cellules de Leydig), C5 (les cellules interstitielles péritubulaires), C6b (cellules de Sertoli contrôles), C7 (cellules de Sertoli invalidées pour *Nr5a1*). On constate que *Hsd17b1* comme *Hsd17b3* s'expriment uniquement dans les groupes C6b (cellules de Sertoli contrôles).

(B) Graphique en boîtes à moustaches illustrant l'expression log2 des gènes indiqués dans les cellules de Sertoli contrôles et invalidées pour *Nr5a1*.

CG (Figure 39). Au final, les mâles *Nr5a1*^{SC-/-} présentent une diminution drastique de l'expression de *Hsd17b3* et *Hsd17b1* dans les CS, mais l'expression de *Hsd17b12* reste inchangée dans tous les autres types cellulaires (Figure 39). Ainsi, la présence de *Hsd17b12* dans toutes ces cellules pourrait permettre le maintien d'une production suffisante de testostérone, et par conséquent permettre la différenciation du tractus urogénital mâle. Cette production d'androgène semble cependant insuffisante pour permettre la croissance normale des organes génitaux masculins, qui restent hypoplasiques. Pour confirmer cette hypothèse, il serait judicieux, d'invalider simultanément *Nr5a1* dans les CS et *Hsd17b12* dans les types cellulaires de la gonade où nous avons détecté son expression. Pour ce faire, on peut envisager d'utiliser simultanément plusieurs recombinaisons Cre actives dans différents types cellulaires.

Toutefois, malgré le fait que les CLF expriment *Hsd17b12*, des études montrent qu'il est peu probable qu'elles participent à la dernière étape de synthèse de la testostérone. Dans leur étude, Ken-Ichirou Morohashi et son équipe mettent en culture des CLF, des SC et des CLA en présence d'androstandione pour mesurer leur capacité à produire de la testostérone. Ils observent que les CLF, bien qu'elles expriment *Hsd17b12* d'après nos résultats, ne sont capables de produire de la testostérone que lorsqu'elles sont cultivées en présence de CS. Il serait intéressant de compléter l'étude de Ken-Ichirou Morohashi et son équipe en cultivant des CLF en présence de cellules endothéliales, de macrophages, de CG ou de cellules interstitielles et péritubulaires qui expriment toutes *Hsd17b12*. Cela permettrait d'identifier le type cellulaire avec lequel les CLF interagissent pour produire la testostérone. Il serait aussi intéressant de savoir si les cellules qui expriment *Hsd17b12* sont capables de réaliser toutes les étapes de synthèse de la testostérone ou si, comme les CS, elles ne se chargent que de la dernière étape. Toutefois, nous gardons à l'esprit que les hydroxystéroïdes déshydrogénases sont nombreuses. C'est pourquoi nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse qu'une autre enzyme de cette famille soit responsable de la production de testostérone.

Enfin et de manière surprenante, les mutants *Mdm2*^{SC-/-} présentent des taux de testostérone diminués (Fouchecourt et al., 2016). A l'inverse, nos mutants *Nr5a1*^{SC-/-} et les mutants *Wt1*^{SC-/-} affichent des taux de testostérone normaux (Gao et al., 2006). Tous ces modèles présentent un tractus urogénital mâle hypoplasique avec la présence des dérivées des canaux de Müller. Le modèle *Nr5a1*^{SC-/-} de l'équipe de Pancharatnam Jeyasuria et le modèle d'ablation des CS par traitement à la toxine diphtérique possèdent quant à eux des tractus urogénitaux normalement masculinisés, sûrement parce que la disparition des CS est incomplète dans ces modèles (Rebourcet et al., 2014 ; Anamthathmakula et al., 2019). Pour élucider cette question, il faut

déterminer à quel moment et à quelle dose la testostérone testiculaire produite par les CL est importante pour aboutir à un tractus urogénital mâle totalement développé.

Pour conclure, l'hermaphrodisme des animaux *Nr5a1^{SC-/-}* était prévisible, d'une part parce que *Amh* est une cible de NR5A1, d'autre part parce que les CS sont essentielles à la production de testostérone. Par contre, la présence de taux normaux de testostérone circulante à la naissance est surprenante, dans la mesure où des signes évidents de sous-exposition aux androgènes sont observés.

8. *Nr5a1* joue-t-il un rôle dans l'homéostasie des centrosomes dans les cellules de Sertoli ?

Le centrosome est un organelle cytoplasmique, essentiel à l'organisation des microtubules et la formation du fuseau mitotique durant les divisions cellulaires. En condition normale, le centrosome se duplique une fois pour obtenir deux centrosomes qui se placeront de part et d'autre de la cellule pour organiser les fuseaux mitotiques. Quand plus de deux centrosomes sont présents, la mitose est multipolaire et la ségrégation des chromosomes ne se fait pas correctement. La cellule donne naissance non pas à deux cellules filles génétiquement identiques, mais des cellules filles porteuses d'un nombre de chromosomes aberrant, un phénomène appelé aneuploïdie. Cette aneuploïdie provoque généralement la mort des cellules. C'est pourquoi l'homéostasie des centrosomes est essentielle pour garantir la stabilité du génome durant les divisions cellulaires (Lai et al., 2011 ; Wang et al., 2014).

En plus de son rôle en tant que récepteur nucléaire, *Nr5a1* est impliqué dans l'homéostasie des centrosomes. En effet, l'équipe de Bon-Chu Chung a découvert que la déplétion de *Nr5a1* dans des cellules corticosurrénales et des cellules de Leydig provoque une multiplication excessive des centrosomes. Je me suis donc demandé si *Nr5a1* avait un rôle dans l'homéostasie des centrosomes dans les CS, et si un défaut de duplication des centrosomes pouvait être la cause de la mort des CS dépourvues de NR5A1. Pour répondre à ces questions, j'ai mis en culture durant 24 heures des CS issues de gonades fœtales, puis j'ai compté le nombre de centrosomes présent dans chaque cellule. L'expression du rapporteur fluorescent YFP m'a permis d'identifier les CS, dans lesquelles les centrosomes sont visualisés en détectant la tubuline gamma (**Figure 40**). Je n'ai pas réussi à démontrer que les CS invalidées pour *Nr5a1* possèdent davantage de centrosomes que les CS des animaux contrôles. Je me suis cependant heurtée à plusieurs problèmes techniques et notamment la durée des cultures. Quand les cellules

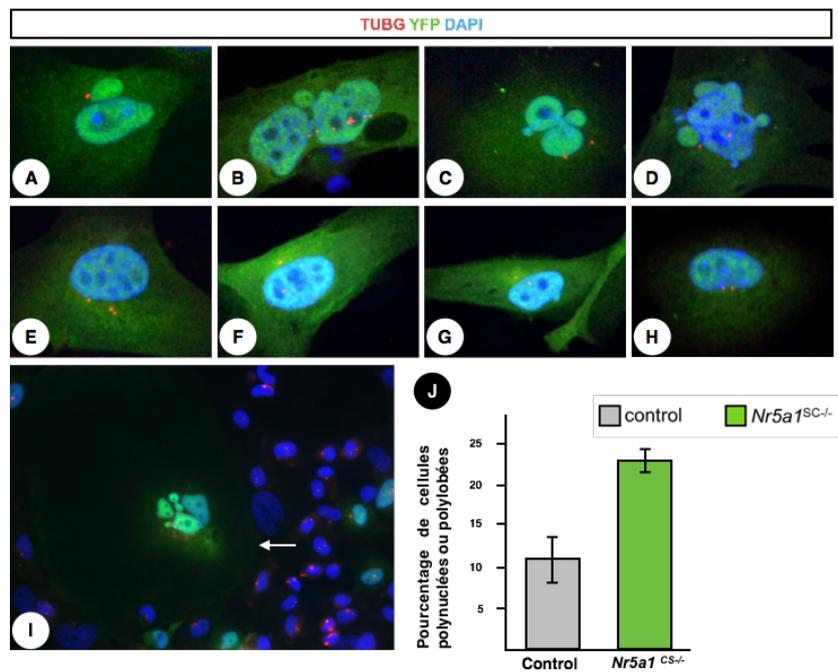


Figure 40 : Méthode de comptage des cellules polynucléées ou polylobées et présentant un nombre anormal de centrosomes

Détection de TUBG en rouge et YFP en vert les noyaux sont contre colorés au DAPI.

(A-H) Exemples représentatifs de cellules observées dans les cultures de gonades à 14,50jpc.

(A-D) Cellules avec des noyaux polylobés ou polynucléés.

(B,E) Cellules avec un nombre anormalement élevé de centrosomes.

(F-H) Cellules avec un nombre normal de centrosomes et de noyaux.

(I) Cellule anormalement grosse ou ensemble de cellules formant ce qui ressemble à un syncytium.

(J) Comparaison du pourcentage de cellules polynucléées ou polylobées entre deux cultures de testicules à 14,50jpc.

sont cultivées pendant 48 heures ou plus, une grande proportion des CS sont anormalement grosses et forment ce qui ressemble à des syncytiums (**Figure 40 I**). A l'inverse, quand les cultures durent 24 heures, les CS se divisent peu et une écrasante majorité d'entre elles ne possède qu'un seul centrosome. En résumé, trop peu de cellules entrent en division en 24 heures de culture, tandis que trop de cellules dégénèrent et fusionnent au-delà de 24 heures de culture. La fenêtre de temps qui permet de voir un défaut du nombre de centrosomes lorsque les CS sont mises en culture est très courte et techniquement difficile à étudier.

J'ai néanmoins constaté qu'une proportion significative des CS invalidées pour *Nr5a1* avait une morphologie nucléaire atypique après 24 heures de culture (**Figure 40 J**). Comme illustré dans la **Figure 40 A-D**, il est difficile de déterminer si les CS sont polynucléées ou si les noyaux sont polylobés, voire fragmentés. La polynucléation d'une cellule avec des noyaux de tailles très différentes peut constituer le signe d'une division mitotique asymétrique et donc d'une duplication anormale des centrosomes (Wang et al., 2014). La présence de noyaux polylobés ou fragmentés peut également être le signe de l'entrée en apoptose des cellules (**Figure 40 A-D**) (Truttmann et al., 2020). La présence de ces nombreuses cellules avec des nucléations atypiques rend difficiles les comptages des centrosomes. Souvent je n'ai pas réussi à déterminer si deux cellules étaient proches ou si une seule cellule était polynucléée. Dans cette situation, il est difficile d'assigner les centrosomes à une cellule précise. En ne tenant compte que des cellules mononucléées, il n'y a pas de différence du nombre de centrosomes entre les CS contrôles et les CS invalidées pour *Nr5a1* (**Figure 40 E-H**).

9. L'invalidation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli après la naissance

Mon travail montre que l'expression de *Nr5a1* est essentielle à la survie des CS après la différenciation sexuelle chez l'embryon. Environ 10 jours après la naissance, les CS cessent de se diviser pour devenir post-mitotiques. Compte tenu de la possible implication de *Nr5a1* dans l'homéostasie des centrosomes, je me suis demandé si l'invalidation de *Nr5a1* dans les CS a un impact sur leur survie une fois que celles-ci sont devenues post-mitotiques, et, plus globalement, un impact sur l'intégrité du testicule et la spermatogénèse.

Pour cela, j'ai généré un modèle de souris mutantes dans lequel *Nr5a1* est invalidé dans les CS après la naissance, grâce à l'utilisation de la recombinaison Cre *Sox9-CreERT²* inducible par le tamoxifène (TAM). Ce système permet de choisir le moment de l'invalidation du gène d'intérêt (Kopp et al., 2011). Afin d'induire l'excision de *Nr5a1*, j'ai essayé plusieurs

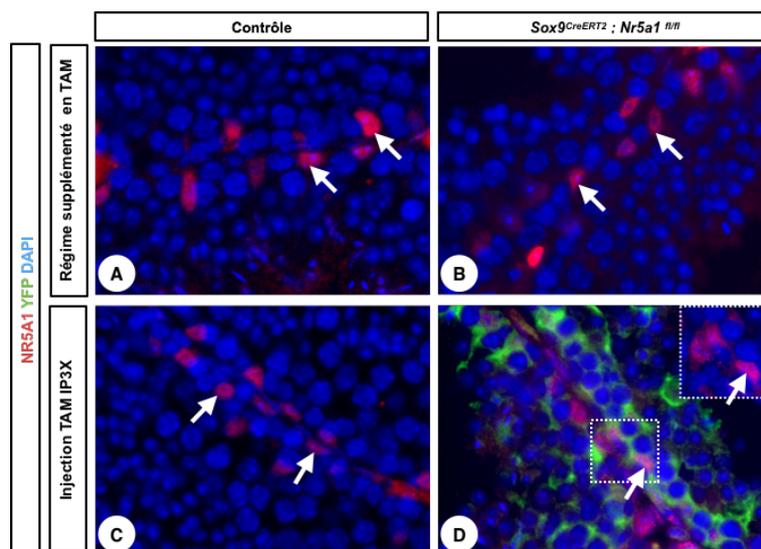


Figure 41 : Échec de l'invalidation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli à l'aide de *Sox9-creERT2*
 Détection de NR51A en rouge et YFP en vert les noyaux sont contre colorés au DAPI. Seul l'individu de l'image **D** est porteur du transgène rapporteur *R26ReYFP*.

(**A,B**) Souris âgées de 24 semaines nourries avec un régime supplémenté en tamoxifène (TAM) durant un mois de 10 à 14 semaines.

(**C,D**) Souris âgés de 12 semaines traitées au tamoxifène par injection intrapéritonéale (IP) à 12,14 et 16 jours après la naissance à raison de 100uL (10mg/ml).

traitements. Dans un premier temps, j'ai reproduit le protocole décrit dans l'article de l'équipe de Rafael Jiménez (Barrionuevo et al., 2016). Ils y expliquent que les traitements par gavage sont soit mortels lorsque le TAM est à forte dose, soit inefficace lorsque le TAM est à des doses réduites. Ils ont alors opté pour un régime alimentaire supplémenté en TAM durant un mois. Ce régime s'est révélé efficace pour exciser leurs gènes d'intérêt (*Sox8* et *Sox9*), avec un taux de survie des animaux de 100% (Barrionuevo et al., 2016). J'ai donc nourri les souris *Nr5a1^{L2/L2}; Sox9-CreERT²* avec ce régime alimentaire durant 1 et 2 mois, puis, j'ai analysé l'expression de NR5A1 dans les CS par IHC. Malheureusement, les CS expriment toujours NR5A1, à un niveau similaire à celui observé chez les souris contrôles (Figure 41).

Dans un second temps, j'ai essayé d'induire l'excision par la recombinaison CreERT² en injectant du TAM dans la cavité intrapéritonéale des souris, à 10 jours environ après la naissance. La présence du rapporteur *Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos* (Srinivas et al., 2001) permet de visualiser si le traitement a provoqué la translocation de CreERT² et l'excision efficace du transgène. Après 3 injections de TAM à 12, 14 et 16 jours après la naissance, les animaux ont été analysés à 12 semaines. Le rapporteur YFP est détecté dans le cytoplasme de 56% des CS mais NR5A1 est détecté dans la totalité des CS, même dans celles qui expriment YFP. Guoqiang Gu et son équipe ont publié un article décrivant le même phénomène, indiquant que l'excision d'un rapporteur fluorescent ne reflète pas forcément l'excision d'une autre cible d'intérêt (Liu et al., 2013). Au final, ces contraintes techniques ne m'ont pas permis de déterminer le rôle de *Nr5a1* dans les CS post-mitotiques.

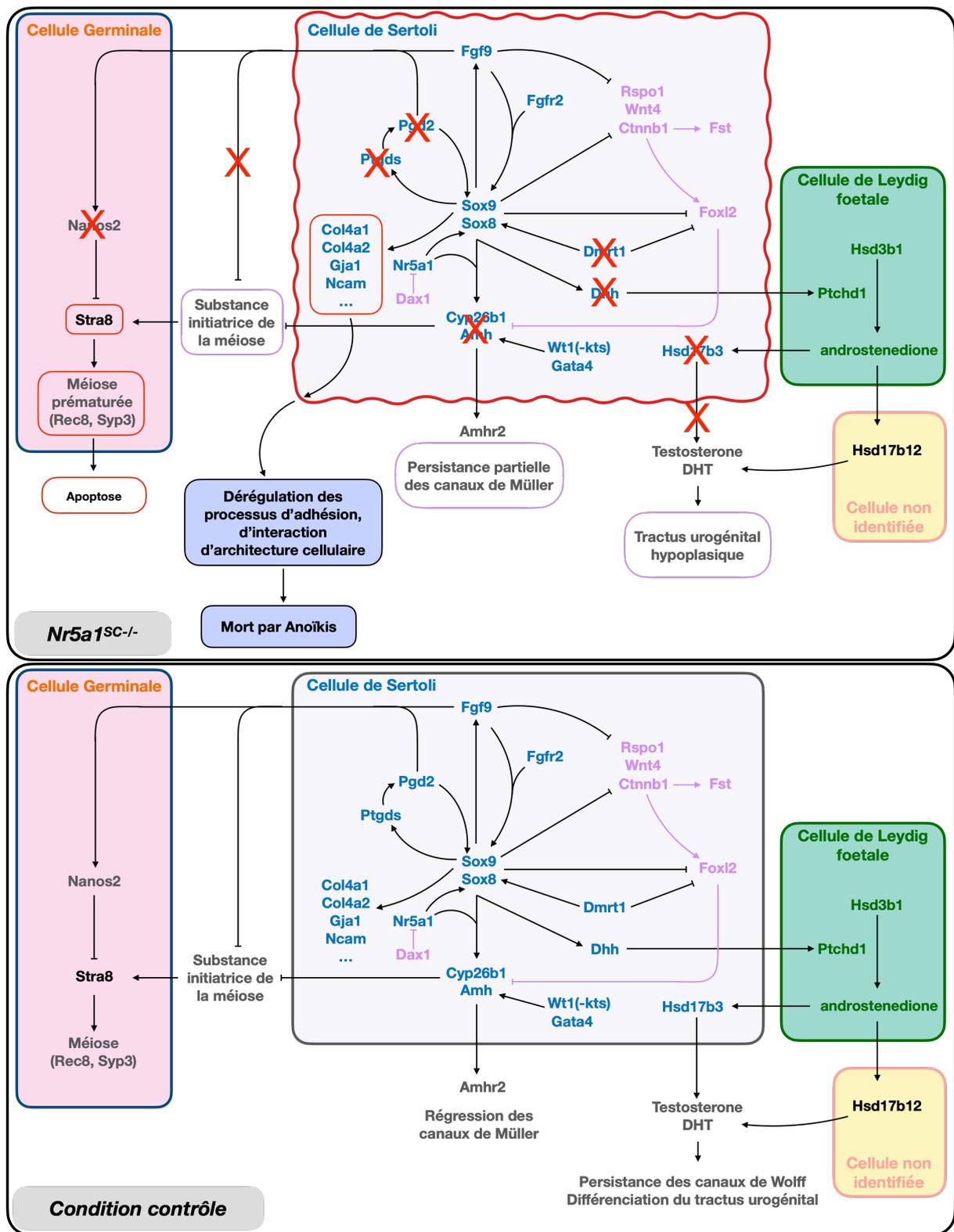


Figure 42 : Vue globale des évènements provoqués par l’invalidation de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli

Les croix rouges sur les gènes illustrent la diminution ou l’absence de leur expression que nous avons mesurée.

Les encadrés en rouges autour des gènes illustrent une augmentation d’expression que nous avons mesurée.

10. Conclusion (Figure 42)

L'activité et l'identité des CS sont maintenues grâce à un réseau génique complexe et interdépendant. Notre étude montre que l'inactivation de *Nr5a1* à partir de 13,50jpc provoque un déséquilibre de tout le réseau.

Pour commencer, l'inactivation de *Nr5a1* provoque la perte de l'expression de *Sox9* qui est l'acteur central de la voie de différenciation masculine. L'absence de NR5A1 et de SOX9 induit la baisse de l'expression de leurs cibles directes que sont *Amh*, *Cyp26b1*, *Ptgds*, *Dhh*. La perte de l'activité de CYP26B1 et de PTGDS induit l'entrée en méiose des CG, qui ne sont plus protégées de la substance initiatrice de la méiose (qui ne peut pas être l'acide rétinoïque). La réduction de l'expression des gènes sertoliens, *Nr5a1*, *Dmrt1*, *Sox9* et *Sox8*, permet la levée de l'inhibition qu'ils exerçaient sur les gènes impliqués dans la différenciation des cellules de la granulosa comme *Foxl2*, *Fst*, *Rspo1* ou *Wnt4*. Nous supposons qu'un mécanisme similaire de levée de l'inhibition de l'expression des gènes est responsable de la réexpression de marqueurs des précurseurs somatiques et interstitiels précoces.

La baisse d'expression de *Hsd17b3* et *Hsd17b1* par les CS dépourvues de NR5A1 induit une production insuffisante de testostérone durant le développement fœtal. Les organes composants le tractus urogénital mâle sont alors hypoplasiques. Des taux basaux de testostérone sont néanmoins garantis par la présence d'autres hydroxystéroïdes déshydrogénases, produites par d'autres cellules de la gonade qui restent à identifier. La baisse de l'expression de *Amh* provoquée par l'absence de NR5A1 et SOX9 induit, quant à elle, la persistance des dérivés des canaux de Müller qui donnent naissance à un utérus et un vagin.

Enfin, la baisse d'expression de *Sox9* et *Sox8* dans les CS nulles pour NR5A1, associée à leur dé- (ou *trans*-) différenciation, participe de la désorganisation des processus d'adhésion, d'interaction et d'architecture cellulaire, conduisant à la mort des CS par anoïkis.

Conclusion générale

Conclusion générale

La formation du testicule à partir du primordium gonado-surrénalien se déroule en plusieurs étapes nécessitant l'activation de nombreuses cascades d'expression de gènes. L'expression de *Nr5a1* est nécessaire à chaque étape de ce processus. Durant la différenciation sexuelle, NR5A1 et SRY permettent l'initiation de l'expression de *Sox9*, un gène essentiel à la différenciation sexuelle et la différenciation des CS. Une fois la différenciation sexuelle achevée, l'expression de NR5A1 est maintenue dans les CS mais, son rôle n'est pas totalement élucidé à ces stades ultérieurs du développement.

Mon projet de thèse, avait justement pour objectif d'étudier le rôle de *Nr5a1* dans les CS, après la différenciation sexuelle. Pour cela, j'ai généré un modèle de souris mutantes (*Nr5a1^{SC-}*), dans lequel le gène *Nr5a1* est invalidé uniquement dans les CS, à partir de 13,50jpc. J'ai d'abord observé l'implication de *Nr5a1* dans le maintien de la fonction sertolienne. Les CS invalidée pour *Nr5a1* n'expriment plus des gènes qui déterminent l'identité sertolienne (dont *Sox9*, *Sox8*, *Dmrt1*). Cette dérégulation provoque la désorganisation progressive des cordons séminifères et des défauts dans la composition de la matrice extracellulaire des CS. De plus, elles ne sont plus en mesure de protéger les cellules germinales qui entrent en méiose prématurément, ce qui a conduit à leur perte progressive. J'ai ensuite observé que les CS sont elles aussi perdues progressivement pour devenir totalement absentes à partir de la naissance. J'ai montré que la mort des CS dépourvues de *Nr5a1* n'implique pas TRP53, comme le laissait croire la littérature. Pour mieux comprendre le destin des CS dépourvues de *Nr5a1*, j'ai réalisé une expérience de séquençage d'ARN (single cell RNA-seq) des cellules composant la gonade des souris contrôles et mutantes *Nr5a1^{Sert-/-}* à E14.5. Grâce à cette approche et en comparant les transcriptomes à ceux des précurseurs et des descendants des cellules exprimant *Nr5a1* récemment publiés, j'ai montré qu'une partie des CS mutantes se différencie en précurseurs précoces des cellules somatiques de testicule, et qu'une autre partie se *trans*-différencie en cellules de granulosa. Cette analyse m'a aussi permis de proposer que les CS mutantes meurent par "anoïkis", un processus de mort cellulaire lié à des modifications de l'ancrage des CS à la lame basale de l'épithélium séminifère, de leur cytosquelette, leur matrice extracellulaire et leurs jonctions intercellulaires. J'ai ainsi montré que NR5A1 agit comme le gardien de l'identité des cellules de Sertoli au cours du développement testiculaire, un rôle jusqu'à présent méconnu.

Dans un contexte plus global, un modèle présentant une disparition des CS après la différenciation sexuelle représente un outil important. C'est grâce à cela que j'ai pu montrer que l'expression de signaux émanant des CS comme *Dhh* et *Pdgfra* ne sont pas nécessaires à l'émergence et à la fonction des autres cellules somatiques après 13,50jpc.

Les mâles *Nr5a1*^{Ser-/-} affichent une hypoplasie des vésicules séminales et de la prostate, ainsi qu'une distance ano-génitale réduite. Ces anomalies pourraient refléter un défaut de production de testostérone pendant la vie fœtale, qui s'expliquerait par la perte des CS mais les animaux *Nr5a1*^{Ser-/-} présentent des taux de testostérone normaux. Mes résultats suggèrent donc plutôt que les CS ne sont pas indispensables pour maintenir une production de testostérone normale.

Pour conclure mon travail a mis en lumière des rôles méconnus de *Nr5a1* dans les cellules de Sertoli après la différenciation sexuelle. De manière plus globale ces résultats permettent d'avancer dans l'étude des signaux que les CS envoient aux autres cellules composants la gonade masculine pour permettre la formation d'un système urogénital fonctionnel.

Bibliographie

Bibliographie

- Adams, I.R., and McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: Switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* *129*, 1155–1164.
- Al-Attar, L., Noël, K., Dutertre, M., Belville, C., Forest, M.G., Burgoyne, P.S., Josso, N., and Rey, R. (1997). Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J. Clin. Invest.* *100*, 1335–1343.
- Anamthathmakula, P., Miryala, C.S.J., Moreci, R.S., Kyathanahalli, C., Hassan, S.S., Condon, J.C., and Jeyasuria, P. (2019). Steroidogenic Factor 1 (Nr5a1) is Required for Sertoli Cell Survival Post Sex Determination. *Sci. Rep.* *9*, 1–12.
- Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., and Rowan, B.G. (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl. Recept. Signal.* *10*.
- Anderson, R., Fässler, R., Georges-Labouesse, E., Hynes, R.O., Bader, B.L., Kreidberg, J.A., Schaible, K., Heasman, J., and Wylie, C. (1999). Mouse primordial germ cells lacking $\beta 1$ integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* *126*, 1655–1664.
- Anderson, R., Copeland, T.K., Schöler, H., Heasman, J., and Wylie, C. (2000). The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech. Dev.* *91*, 61–68.
- Andersson, S., Berman, D.M., Jenkins, E.P., and Russell, D.W. (1991). Deletion of steroid 5α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* *354*, 159–161.
- Anupa, G., Sharma, J.B., Roy, K.K., Sengupta, J., and Ghosh, D. (2019). An assessment of the multifactorial profile of steroid-metabolizing enzymes and steroid receptors in the eutopic endometrium during moderate to severe ovarian endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *17*, 1–16.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* *81*, 1269–1304.
- Arango, N.A., Lovell-Badge, R., and Behringer, R.R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: In vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* *99*, 409–419.
- Arango, N.A., Kobayashi, A., Wang, Y., Jamin, S.P., Lee, H.H., Orvis, G.D., and Behringer, R.R. (2008). A mesenchymal perspective of Müllerian duct differentiation and regression in *Amhr2-lacZ* mice. *Mol. Reprod. Dev.* *75*, 1154–1162.
- Armstrong, J.F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W.A., Hastie, N.D., and Bard, J.B.L. (1993). The expression of the Wilms' tumour gene, *WT1*, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* *40*, 85–97.

Arnold J. Levine (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88, 323–331.

Auguste, A., Chassot, A.A., Grégoire, E.P., Renault, L., Pannetier, M., Treier, M., Pailhoux, E., and Chaboissier, M.C. (2012). Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. *Sex. Dev.* 5, 304–317.

Aydoğdu, N., Rudat, C., Trowe, M.O., Kaiser, M., Lüdtkke, T.H., Taketo, M.M., Christoffels, V.M., Moon, A., and Kispert, A. (2018). TBX2 and TBX3 act downstream of canonical WNT signaling in patterning and differentiation of the mouse ureteric mesenchyme. *Dev.* 145.

Baarends, W.M., Van Helmond, M.J.L., Post, M., Van der Schoot, P.J.C.M., Hoogerbrugge, J.W., De Winter, J.P., Uilenbroek, J.T.J., Karels, B., Wilming, L.G., Meijers, J.H.C., et al. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development* 120, 189–197.

Babu, P.S., Bavers, D.L., Beuschlein, F., Shah, S., Jeffs, B., Jameson, J.L., and Hammer, G.D. (2002). Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: Increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* 143, 665–673.

Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Jayakody, I., Taketo, M.M., Scherer, G., and Harley, V.R. (2008). Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Dev. Biol.* 314, 71–83.

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.

Bandiera, R., Vidal, V.P.I., Motamedi, F.J., Clarkson, M., Sahut-Barnola, I., vonGise, A., Pu, W.T., Hohenstein, P., Martinez, A., and Schedl, A. (2013). WT1 Maintains Adrenal-Gonadal Primordium Identity and Marks a Population of AGP-like Progenitors within the Adrenal Gland. *Dev. Cell* 27, 5–18.

Barbaro, M., Oscarson, M., Schoumans, J., Staaf, J., Ivarsson, S.A., and Wedell, A. (2007). Isolated 46,XY gonadal dysgenesis in two sisters caused by a Xp21.2 interstitial duplication containing the DAX1 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3305–3313.

Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Döderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., et al. (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671–675.

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.

Barrionuevo, F., Georg, I., Scherthan, H., Lécureuil, C., Guillou, F., Wegner, M., and Scherer, G. (2009). Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev. Biol.* 327, 301–312.

Barrionuevo, F.J., Hurtado, A., Kim, G.J., Real, F.M., Bakkali, M., Kopp, J.L., Sander, M., Scherer, G., Burgos, M., and Jiménez, R. (2016). Sox9 and Sox8 protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *Elife* 5, 1–23.

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.

Barsoum, I., Bingham, N., Parker, K.L., Jorgensen, J.S., and Yao, H.H.C. (2009). Activation of the Hedgehog Pathway in the Mouse Fetal Ovary Leads to Ectopic Appearance of Fetal Leydig Cells and Female Pseudohermaphroditism. *Dev Biol* 329, 96–103.

Barsoum, I.B., Kaur, J., Ge, R.S., Cooke, P.S., and Yao, H.H.C. (2013). Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *FASEB J.* 27, 2657–2666.

Bashamboo, A., Donohoue, P.A., Vilain, E., Rojo, S., Calvel, P., Seneviratne, S.N., Buonocore, F., Barseghyan, H., Bingham, N., Rosenfeld, J.A., et al. (2016). A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development. *Hum. Mol. Genet.* 25, 3446–3453.

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 Müllerian inhibiting substance. *Nature* 345, 167–170.

Behringer, R.R., Finegold, M.J., and Cate, R.L. (1994). Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79, 415–425.

Bellemare, V., Phaneuf, D., Luu-The, V., and Luu-The, V. (2010). Target deletion of the bifunctional type 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in mice results in reduction of androgen and estrogen levels in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2, 311–318.

Bellutti, L., Abby, E., Tourpin, S., Messiaen, S., Moison, D., Trautmann, E., Guerquin, M.J., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., and Livera, G. (2019). Divergent roles of cyp26b1 and endogenous retinoic acid in mouse fetal gonads. *Biomolecules* 9 (10): 536.

Bendel-Stenzel, M.R., Gomperts, M., Anderson, R., Heasman, J., and Wylie, C. (2000). The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech. Dev.* 91, 143–152.

Bernard, P., Ryan, J., Sim, H., Czech, D.P., Sinclair, A.H., Koopman, P., and Harley, V.R. (2012). Wnt signaling in ovarian development inhibits Sf1 activation of Sox9 via the Tesco enhancer. *Endocrinology* 153, 901–912.

Bi, W., Huang, W., Whitworth, D.J., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., and De Crombrughe, B. (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6698–6703.

Biason-Lauber, A., Konrad, D., Meyer, M., deBeaufort, C., and Schoenle, E.J. (2009). Ovaries and Female Phenotype in a Girl with 46,XY Karyotype and Mutations in the CBX2 Gene. *Am. J. Hum. Genet.* *84*, 658–663.

Bielinska, M., Seehra, A., Toppari, J., Heikinheimo, M., and Wilson, D.B. (2007). GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse. *Dev. Dyn.* *236*, 203–213.

Birk, O.S., Caslano, D.E., Wassif, C.A., Cogilat, T., Zhaos, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S.P., Kreidberg, J.A., Parker, K.L., et al. (2000). The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* *403*, 909–913.

Bishop, C.E., Whitworth, D.J., Qin, Y., Agoulnik, A.I., Agoulnik, I.U., Harrison, W.R., Behringer, R.R., and Overbeek, P.A. (2000). A transgenic insertion upstream of *Sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet.* *26*, 490–494.

Bitgood, M.J., Shen, L., and McMahon, A.P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* *6*, 298–304.

Bland, M.L., Jamieson, C.A.M., Akana, S.F., Bornstein, S.R., Eisenhofer, G., Dallman, M.F., and Ingraham, H.A. (2000). Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 14488–14493.

Bland, M.L., Fowkes, R.C., and Ingraham, H.A. (2004). Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development Versus endocrine function. *Mol. Endocrinol.* *18*, 941–952.

Bocquel, M.T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1989). The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res.* *17*, 2581–2595.

Bogani, D., Siggers, P., Brixey, R., Warr, N., Beddow, S., Edwards, J., Williams, D., Wilhelm, D., Koopman, P., Flavell, R.A., et al. (2009). Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4) reveals a requirement for MAPK signalling in mouse sex determination. *PLoS Biol.* *7* (9):e1000196.

Bouchard, M.F., Bergeron, F., Grenier Delaney, J., Harvey, L.M., and Viger, R.S. (2019). In vivo ablation of the conserved GATA-binding motif in the *amh* promoter impairs *amh* expression in the male mouse. *Endocrinology* *160*, 817–826.

Boulanger, L., Pannetier, M., Gall, L., Allais-Bonnet, A., Elzaïat, M., Le Bourhis, D., Daniel, N., Richard, C., Cotinot, C., Ghyselinck, N.B., et al. (2014). *FOXL2* Is a Female Sex-Determining Gene in the Goat. *Curr. Biol.* *24*, 404–408.

Bouma, G.J., Washburn, L.L., Albrecht, K.H., and Eicher, E.M. (2007). Correct dosage of *Fog2* and *Gata4* transcription factors is critical for fetal testis development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14994–14999.

- Bowles, J., and Koopman, P. (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* *134*, 3401–3411.
- Bowles, J., Schepers, G., and Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* *227*, 239–255.
- Bowles, J., Knight, D., Christopher, S., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., et al. (2006). Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *312*, 596–601.
- 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., Feng, C.W., Miles, K., Ineson, J., Spiller, C., and Koopman, P. (2016). ALDH1A1 provides a source of meiosis-inducing retinoic acid in mouse fetal ovaries. *Nat. Commun.* *7*, 1–8.
- Bradford, S.T., Wilhelm, D., Bandiera, R., Vidal, V., Schedl, A., and Koopman, P. (2009). A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry in vivo. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 3429–3438.
- Brendel, C., Gelman, L., and Auwerx, J. (2002). Multiprotein bridging factor-1 (MBF-1) is a cofactor for nuclear receptors that regulate lipid metabolism. *Mol. Endocrinol.* *16*, 1367–1377.
- Brennan, J., Tilmann, C., and Capel, B. (2003). Pdgfr- α mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev.* *17*, 800–810.
- Bryan, M.K.O., Takada, S., Kennedy, C.L., Scott, G., Harada, S., Ray, M.K., Dai, Q., Wilhelm, D., Kretser, D.M. De, Eddy, E.M., et al. (2008). Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Dev Biol* *316*, 359–370.
- Buganim, Y., Itskovich, E., Hu, Y.C., Cheng, A.W., Ganz, K., Sarkar, S., Fu, D., Welstead, G.G., Page, D.C., and Jaenisch, R. (2012). Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic sertoli-like cells by defined factors. *Cell Stem Cell* *11*, 373–386.
- Bullejos, M., and Koopman, P. (2001). Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev. Dyn.* *221*, 201–205.
- Bullejos, M., and Koopman, P. (2005). Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-YDOM sex reversal. *Dev. Biol.* *278*, 473–481.
- Buonocore, F., and Achermann, J.C. (2020). Primary adrenal insufficiency: New genetic causes and their long-term consequences. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. *92*, 11–20.
- Burger, L.L., Haisenleder, D.J., Dalkin, A.C., and Marshall, J.C. (2004). Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J. Mol. Endocrinol.* *33*, 559–584.
- Burney, R.O., and Giudice, L.C. (2012). Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* *98*, 511–519.

Byskov, A.G., and Saxén, L. (1976). Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro. *Dev. Biol.* 52, 193–200.

Campolo, F., Gori, M., Favaro, R., Nicolis, S., Pellegrini, M., Botti, F., Rossi, P., Jannini, E.A., and Dolci, S. (2013). Essential role of Sox2 for the establishment and maintenance of the germ cell line. *Stem Cells* 31, 1408–1421.

Cantú, A. V., Altshuler-Keylin, S., and Laird, D.J. (2016). Discrete somatic niches coordinate proliferation and migration of primordial germ cells via Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 214, 215–229.

Cao, G., Garcia, C.K., Wyne, K.L., Schultz, R.A., Parker, K.L., and Hobbs, H.H. (1997). Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J. Biol. Chem.* 272, 33068–33076.

Caricasole, A., Duarte, A., Larsson, S.H., Hastie, N.D., Little, M., Holmes, G., Todorov, I., and Ward, A. (1996). RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7562–7566.

Di Carlo, A., and De Felici, M. (2000). A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell development. *Dev. Biol.* 226, 209–219.

Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., and Parker, K.L. (1997). Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11540–11545.

Carré, G.A., Siggers, P., Xipolita, M., Brindle, P., Lutz, B., Wells, S., and Greenfield, A. (2018). Loss of p300 and CBP disrupts histone acetylation at the mouse Sry promoter and causes XY gonadal sex reversal. *Hum. Mol. Genet.* 27, 190–198.

Chaboissier, M.C., Kobayashi, A., Vidal, V.I.P., Lützkendorf, S., van de Kant, H.J.G., Wegner, M., de Rooij, D.G., Behringer, R.R., and Schedl, A. (2004a). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131, 1891–1901.

Chaboissier, M.C., Kobayashi, A., Vidal, V.I.P., Lützkendorf, S., van de Kant, H.J.G., Wegner, M., de Rooij, D.G., Behringer, R.R., and Schedl, A. (2004b). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131, 1891–1901.

Chang, H., and Matzuk, M.M. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech. Dev.* 104, 61–67.

Charest, N.J., Zhou, Z. xun, Lubahn, D.B., Olsen, K.L., Wilson, E.M., and French, F.S. (1991). A frameshift mutation destabilizes androgen receptor messenger RNA in the Tfm mouse. *Mol. Endocrinol.* 5, 573–581.

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 β -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/ β -Catenin signaling pathway regulates oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 6 (10):e25641.

Chassot, A.A., Bradford, S.T., Auguste, A., Gregoire, E.P., Pailhoux, E., de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.C. (2012). WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Dev.* 139, 4461–4472.

Chassot, A.A., Rolle, M. Le, Jolivet, G., Stevant, I., Guignonis, J.M., Guignonis, J.M., Silva, F. Da, Silva, F. Da, Nef, S., Pailhoux, E., et al. (2020). Retinoic acid synthesis by ALDH1A proteins is dispensable for meiosis initiation in the mouse fetal ovary. *Sci. Adv.* 6, 1–12.

Chawengsaksohak, K., Svingen, T., Ng, E.T., Epp, T., Spiller, C.M., Clark, C., Cooper, H., and Koopman, P. (2012). Loss of Wnt5a Disrupts Primordial Germ Cell Migration and Male Sexual Development in Mice1. *Biol. Reprod.* 86, 1–12.

Chen, M., Zhang, L., Cui, X., Lin, X., Li, Y., Wang, Y., Wang, Y., Qin, Y., Chen, D., Han, C., et al. (2017). Wt1 directs the lineage specification of sertoli and granulosa cells by repressing Sf1 expression. *Dev.* 144, 44–53.

Chen, S.-R., Chen, M., Wang, X.-N., Zhang, J., Wen, Q., Ji, S.-Y., Zheng, Q.-S., Gao, F., and Liu, Y.-X. (2013). The Wilms Tumor Gene, Wt1, Maintains Testicular Cord Integrity by Regulating the Expression of Col4a1 and Col4a21. *Biol. Reprod.* 88, 1–10.

Chen, W.-Y., Juan, L.-J., and Chung, B. (2005). SF-1 (Nuclear Receptor 5A1) Activity Is Activated by Cyclic AMP via p300-Mediated Recruitment to Active Foci, Acetylation, and Increased DNA Binding. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10442–10453.

Chiquoine, A.D. (1954). The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec.* 118 (2):135-46.

Chu, G.C., Dunn, N.R., Anderson, D.C., Oxburgh, L., and Robertson, E.J. (2004). Differential requirements for Smad4 in TGF β -dependent patterning of the early mouse embryo. *Development* 131, 3501–3512.

Clark, A.M., Garland, K.K., and Russell, L.D. (2000). Desert hedgehog (Dhh) Gene Is Required in the Mouse Testis for Formation of Adult-Type Leydig Cells and Normal Development of Peritubular Cells and Seminiferous Tubules. *Biol. Reprod.* 63, 1825–1838.

Di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J.Y., Vigier, B., Josso, N., and Cate, R. (1994). Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-müllerian hormone. *Mol. Endocrinol.* 8, 1006–1020.

Cocuzza, M., and Agarwal, A. (2007). Nonsurgical treatment of male infertility: Specific and empiric therapy. *Biol. Targets Ther.* 1, 259–269.

Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B., and Ornitz, D.M. (2001). Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9. *Cell* 104, 875–889.

Combes, A.N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., and Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev. Biol.* 326, 112–120.

Committee, N.R.N. (1999). A Unified Nomenclature System for. *Cell* 97, 161–163.

Cooke, P.S., Young, P., Cunha, G.R., and Cooke, P.S. (1991). Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* 128, 2867–2873.

Cool, J., Carmona, F.D., Szucsik, J.C., and Capel, B. (2008). Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the XY gonad. *Sex. Dev.* 2, 128–133.

Cool, J., Defalco, T., and Capel, B. (2012). Testis formation in the fetal mouse: Dynamic and complex de novo tubulogenesis. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 847–859.

Couture, R., and Martin, L.J. (2020). The transcription factors SF-1 and SOX8 cooperate to upregulate Cx43 expression in mouse TM4 sertoli cells. *Biochem. Biophys. Reports* 24, 100828.

Crawford, P.A., Dorn, C., Sadovsky, Y., and Milbrandt, J. (1998). Nuclear Receptor DAX-1 Recruits Nuclear Receptor Corepressor N-CoR to Steroidogenic Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2949–2956.

Cui, S., Ross, A., Stallings, N., Parker, K.L., Capel, B., and Quaggin, S.E. (2004). Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development* 131, 4095–4105.

Cunha, G.R., Alarid, E.T., Turner, T., Donjacour, A.A., Boutin, E.L., and Foster, B.A. (1992). Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal–epithelial interactions, and growth factors. *J. Androl.* 13, 465–475.

Damm, K., Heyman, R.A., Umesono, K., and Evans, R.M. (1993). Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2989–2993.

Dammer, E.B., Leon, A., and Sewer, M.B. (2007). Coregulator exchange and sphingosine-sensitive cooperativity of steroidogenic factor-1, general control nonderepressed 5, p54, and p160 coactivators regulate cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent cytochrome P450c17 transcription rate. *Mol. Endocrinol.* 21, 415–438.

DeFalco, T., Takahashi, S., and Capel, B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev. Biol.* 352, 14–26.

DeFalco, T., Saraswathula, A., Briot, A., Iruela-Arispe, M.L., and Capel, B. (2013). Testosterone Levels Influence Mouse Fetal Leydig Cell Progenitors Through Notch Signaling. *Biol. Reprod.* 88, 1–12.

Dellovade, T.L., Young, M., Ross, E.P., Henderson, R., Caron, K., Parker, K., and Tobet, S.A. (2000). Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J. Comp. Neurol.* *423*, 579–589.

Desclozeaux, M., Krylova, I.N., Horn, F., Fletterick, R.J., and Ingraham, H.A. (2002). Phosphorylation and Intramolecular Stabilization of the Ligand Binding Domain in the Nuclear Receptor Steroidogenic Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7193–7203.

Deslypere, J.P., Young, M., Wilson, J.D., and McPhaul, M.J. (1992). Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* *88*, 15–22.

DiNapoli, L., Batchvarov, J., and Capel, B. (2006). FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development* *133*, 1519–1527.

Doghman, M., Karpova, T., Rodrigues, G.A., Arhatte, M., De Moura, J., Cavalli, L.R., Virolle, V., Barbry, P., Zambetti, G.P., Figueiredo, B.C., et al. (2007). Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol. Endocrinol.* *21*, 2968–2987.

Doghman, M., Cazareth, J., Douguet, D., Madoux, F., Hodder, P., and Lalli, E. (2009). Inhibition of adrenocortical carcinoma cell proliferation by steroidogenic factor-1 inverse agonists. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 2178–2183.

Drash, A., Sherman, F., Hartmann, W.H., and Blizzard, R.M. (1970). A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J. Pediatr.* *76*, 585–593.

Drews, U. (2000). Local mechanisms in sex specific morphogenesis. *Cytogenet. Cell Genet.* *91*, 72–80.

Ehrlund, A., Anthonisen, E.H., Gustafsson, N., Venteclef, N., Robertson Remen, K., Dandimopoulos, A.E., Galeeva, A., Pelto-Huikko, M., Lalli, E., Steffensen, K.R., et al. (2009). E3 Ubiquitin Ligase RNF31 Cooperates with DAX-1 in Transcriptional Repression of Steroidogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2230–2242.

Evans, T., and Felsenfeld, G. (1989). The erythroid-specific transcription factor eryf1: A new finger protein. *Cell* *58*, 877–885.

Evans, E.P., Ford, C.E., and Lyon, M.F. (1977). Direct evidence of the capacity of the XY germ cell in the mouse to become an oocyte. *Nature* *276*, 430–431.

Ewen, K., Jackson, A., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2010). A male-specific role for p38 mitogen-activated protein kinase in germ cell sex differentiation in mice. *Biol. Reprod.* *83*, 1005–1014.

Fabbri-Scallet, H., de Sousa, L.M., Maciel-Guerra, A.T., Guerra-Júnior, G., and de Mello, M.P. (2020). Mutation update for the NR5A1 gene involved in DSD and infertility. *Hum. Mutat.* *41*, 58–68.

Fahrioglu, U., Murphy, M.W., Zarkower, D., and Bardwell, V.J. (2006). mRNA expression analysis and the molecular basis of neonatal testis defects in Dmrt1 mutant mice. *Sex. Dev. 1*, 42–58.

Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., et al. (2004). Protein Kinase A Potentiates Adrenal 4 Binding Protein/Steroidogenic Factor 1 Transactivation by Reintegrating the Subcellular Dynamic Interactions of the Nuclear Receptor with Its Cofactors, General Control Nonderepressed-5/Transformation/Transcription. *Mol. Endocrinol. 18*, 127–141.

Ferraz-de-Souza, B., Lin, L., and Achermann, J.C. (2011). Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol. Cell. Endocrinol. 336*, 198–205.

Ferraz-De-Souza, B., Hudson-Davies, R.E., Lin, L., Parnaik, R., Hubank, M., Dattani, M.T., and Achermann, J.C. (2011). Sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1, ACAT) is a novel target of steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) in the human adrenal. *J. Clin. Endocrinol. Metab. 96*, 663–668.

Figueiredo, B.C., Cavalli, L.R., Pianovski, M.A.D., Lalli, E., Sandrini, R., Ribeiro, R.C., Zambetti, G., DeLacerda, L., Rodrigues, G.A., and Haddad, B.R. (2005). Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab. 90*, 615–619.

Forman, B.M. (2005). Are those phospholipids in your pocket? *Cell Metab. 1*, 153–155.

Fouchecourt, S., Livera, G., Messiaen, S., Fumel, B., Parent, A.S., Marine, J.C., and Monget, P. (2016). Apoptosis of Sertoli cells after conditional ablation of murine double minute 2 (Mdm2) gene is p53-dependent and results in male sterility. *Cell Death Differ. 23*, 521–530.

Frasier, S.D., Bashore, R.A., and Mosier, H.D. (1964). Gonadoblastoma associated with pure gonadal dysgenesis in monozygous twins. *J. Pediatr. 64*, 740–745.

Freedman, L., Luisi, B., Korszun, R., Basavappa, R., Sigler, P., and Yamamoto, K.R. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature 334*, 543–546.

Frisch, S.M., and Sreaton, R.A. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol. 13*, 555–562.

Fujimoto, Y., Tanaka, S.S., Yamaguchi, Y.L., Kobayashi, H., Kuroki, S., Tachibana, M., Shinomura, M., Kanai, Y., Morohashi, K., Ichirou, Kawakami, K., et al. (2013). Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Dev. Cell 26*, 416–430.

Gao, F., Maiti, S., Alam, N., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., Lécureuil, C., Guillou, F., and Huff, V. (2006). The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103*, 11987–11992.

Gaytan, F., Sangiao-Alvarellos, S., Manfredi-Lozano, M., García-Galiano, D., Ruiz-Pino, F., Romero-Ruiz, A., León, S., Morales, C., Cordido, F., Pinilla, L., et al. (2013). Distinct expression patterns predict differential roles of the mirna-binding proteins, *lin28* and *lin28b*, in the mouse testis: Studies during postnatal development and in a model of hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinology* *154*, 1321–1336.

Ge, R.S., Dong, Q., Sottas, C.M., Papadopoulos, V., Zirkin, B.R., and Hardy, M.P. (2006). In search of rat stem Leydig cells: Identification, isolation, and lineage-specific development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2719–2724.

Georg, I., Barrionuevo, F., Wiech, T., and Scherer, G. (2012). *Sox9* and *Sox8* Are Required for Basal Lamina Integrity of Testis Cords and for Suppression of *FOXL2* During Embryonic Testis Development in Mice. *Biol. Reprod.* *87*, 1–11.

Georgas, K.M., Armstrong, J., Keast, J.R., Larkins, C.E., McHugh, K.M., Southard-Smith, E.M., Cohn, M.J., Batourina, E., Dan, H., Schneider, K., et al. (2015). An illustrated anatomical ontology of the developing mouse lower urogenital tract. *Dev.* *142*, 1893–1908.

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Arch. Zool. Exp. Gen. Paris* *58*, 685–704.

Gierl, M.S., Gruhn, W.H., von Seggern, A., Maltry, N., and Niehrs, C. (2012). *GADD45G* Functions in Male Sex Determination by Promoting p38 Signaling and *Sry* Expression. *Dev. Cell* *23*, 1032–1042.

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.

Gilmore, A.P. (2005). *Anoikis*. *Cell Death Differ.* *12*, 1473–1477.

Giuli, G., Shen, W.H., and Ingraham, H.A. (1997). The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian inhibiting substance, *in vivo*. *Development* *124*, 1799–1807.

Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C., Karlsson, L., and Betsholtz, C. (2000). Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J. Cell Biol.* *149*, 1019–1025.

Gonen, N., Quinn, A., O'Neill, H.C., Koopman, P., and Lovell-Badge, R. (2017). Normal Levels of *Sox9* Expression in the Developing Mouse Testis Depend on the TES/TESCO Enhancer, but This Does Not Act Alone. *PLoS Genet.* *13*, 1–24.

Gonen, N., Futtner, C.R., Wood, S., Alexandra Garcia-Moreno, S., Salamone, I.M., Samson, S.C., Sekido, R., Poulat, F., Maatouk, D.M., and Lovell-Badge, R. (2018). Sex reversal following deletion of a single distal enhancer of *Sox9*. *Science* (80-.). *360*, 1469–1471.

Graham, S., and Gandelman, R. (1986). The expression of ano-genital distance data in the mouse. *Physiol. Behav.* *36*, 103–104.

De Grandi, A., Calvari, V., Bertini, V., Bulfone, A., Peverali, G., Camerino, G., Borsani, G., and Guioli, S. (2000). The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech. Dev.* *90*, 323–326.

Gregory, S.J., and Kaiser, U.B. (2004). Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Semin. Reprod. Med.* *22*, 253–267.

Griswold, M.D., Hogarth, C.A., Bowles, J., and Koopman, P. (2012). Initiating meiosis: The case for retinoic acid. *Biol. Reprod.* *86*, 1–7.

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* *346*, 245–250.

Haber, D.A., Sohn, R.L., Buckler, A.J., Pelletier, J., Call, K.M., and Housman, D.E. (1991). Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 9618–9622.

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

Hakkarainen, J., Zhang, F.P., Jokela, H., Mayerhofer, A., Behr, R., Cisneros-Montalvo, S., Nurmio, M., Toppari, J., Ohlsson, C., Kotaja, N., et al. (2018). Hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 1 expressed by Sertoli cells contributes to steroid synthesis and is required for male fertility. *FASEB J.* *32*, 3229–3241.

Hammes, A., Guo, J.K., Lutsch, G., Leheste, J.R., Landrock, D., Ziegler, U., Gubler, M.C., and Schedl, A. (2001). Two splice variants of the wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* *106*, 319–329.

Hao, H.X., Xie, Y., Zhang, Y., Zhang, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., et al. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* *485*, 195–202.

Harrison, S.M., Campbell, I.M., Keays, M., Granberg, C.F., Villanueva, C., Tannin, G., Zinn, A.R., Castrillon, D.H., Shaw, C.A., Stankiewicz, P., et al. (2013). Screening and familial characterization of copy-number variations in NR5A1 in 46,XY disorders of sex development and premature ovarian failure. *Am. J. Med. Genet. Part A* *161*, 2487–2494.

Hasegawa, T., Zhao, L., Caron, K.M., Majdic, G., Suzuki, T., Shizawa, S., Sasano, H., and Parker, K.L. (2000). Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol. Endocrinol.* *14*, 1462–1471.

Hatano, M., Migita, T., Ohishi, T., Shima, Y., Ogawa, Y., Morohashi, K.I., Hasegawa, Y., and Shibasaki, F. (2016). SF-1 deficiency causes lipid accumulation in Leydig cells via suppression of STAR and CYP11A1. *Endocrine* *54*, 484–496.

Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., and Morohashi, K.I. (1996). Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes to Cells* 1, 663–671.

Hattori, Y., Yamada, S., Yamamoto, M., Orisaka, M., Mizutani, T., and Yoshida, Y. (2015). Ovarian mucinous adenocarcinoma with functioning stroma in postmenopausal women: aromatase and SF-1 expressions. *J. Ovarian Res.* 8, 4–9.

Haupt, Y., Mayat, R., Kazantz, A., and Orent, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296–299.

Hayashi, K., Kobayashi, T., Umino, T., Goitsuka, R., Matsui, Y., and Kitamura, D. (2002). SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. *Mech. Dev.* 118, 99–109.

He, B., Kempainen, J.A., and Wilson, E.M. (2000). FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH₂-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 22986–22994.

Held, J.M., Britton, D.J., Scott, G.K., Lee, E.L., Schilling, B., Baldwin, M.A., Gibson, B.W., and Benz, C.C. (2012). Ligand binding promotes CDK-dependent phosphorylation of ER- α on hinge serine 294 but inhibits ligand-independent phosphorylation of serine 305. *Mol. Cancer Res.* 10, 1120–1132.

Heldring, N., Pawson, T., McDonnell, D., Treuter, E., Gustafsson, J.Å., and Pike, A.C.W. (2007). Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 10449–10455.

Helsen, C., Kerkhofs, S., Clinckemalie, L., Spans, L., Laurent, M., Boonen, S., Vanderschueren, D., and Claessens, F. (2012). Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348, 411–417.

Hermann-Kleiter, N., and Baier, G. (2014). Orphan nuclear receptor NR2F6 acts as an essential gatekeeper of Th17 CD4⁺ T cell effector functions. *Cell Commun. Signal.* 12, 1–12.

Hernandez Gifford, J.A. (2015). The role of WNT signaling in adult ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 150, E137-R148.

Hinkula, M., Pukkala, E., Kyyrönen, P., and Kauppila, A. (2006). Incidence of ovarian cancer of grand multiparous women—A population-based study in Finland. *Gynecol. Oncol.* 103, 207–211.

Hinshelwood, M.M., Repa, J.J., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Mangelsdorf, D.J., and Mendelson, C.R. (2003). Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: Localization in different cell types correlates with differing function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 207, 39–45.

Hiramatsu, R., Matoba, S., Kanai-Azuma, M., Tsunekawa, N., Katoh-Fukui, Y., Kurohmaru, M., Morohashi, K.I., Wilhelm, D., Koopman, P., and Kanai, Y. (2009). A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development* 136, 129–138.

Hofmann, C., Obermeier, F., Artinger, M., Hausmann, M., Falk, W., Schoelmerich, J., Rogler, G., and Grossmann, J. (2007). Cell-Cell Contacts Prevent Anoikis in Primary Human Colonic Epithelial Cells. *Gastroenterology* 132, 587–600.

Hoivik, E.A., Lewis, A.E., Aumo, L., and Bakke, M. (2010). Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Mol. Cell. Endocrinol.* 315, 27–39.

Hołysz, M., Derebecka-Hołysz, N., and Trzeciak, W.H. (2011). Transcription of LIPE gene encoding hormone-sensitive lipase/cholesterol esterase is regulated by SF-1 in human adrenocortical cells: Involvement of protein kinase A signal transduction pathway. *J. Mol. Endocrinol.* 46, 29–36.

Hossain, A., and Saunders, G.F. (2001). The Human Sex-determining Gene SRY Is a Direct Target of WT1. *J. Biol. Chem.* 276, 16817–16823.

Houshdaran, S., Nezhat, C.R., Vo, K.C., Zelenko, Z., Irwin, J.C., and Giudice, L.C. (2016). Aberrant Endometrial DNA Methylation and Associated Gene Expression in Women with Endometriosis. *Biol. Reprod.* 95 (5) 93, 1-16.

Hu, M.C., Hsu, N.C., Hadj, N.B. El, Pai, C.I., Chu, H.P., Wang, C.K.L., and Chung, B.C. (2002). Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of *Cyp11a1*. *Mol. Endocrinol.* 16, 1943–1950.

Hu, Y.C., Okumura, L.M., and Page, D.C. (2013). *Gata4* Is Required for Formation of the Genital Ridge in Mice. *PLoS Genet.* 9, 1–12.

Hu, Z., Shen, W.-J., Kraemer, F.B., and Azhar, S. (2012). MicroRNAs 125a and 455 Repress Lipoprotein-Supported Steroidogenesis by Targeting Scavenger Receptor Class B Type I in Steroidogenic Cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 5035–5045.

Hu, Z. ying, Tang, L. dan, Zhang, H. yu, Niu, J. ya, and Lou, M. (2015). Clinicopathological significance of steroidogenic factor-1 expression in ovarian cancer versus ovarian sex cord stromal tumor. *Tumor Biol.* 36, 1429–1435.

Huang, B., Wang, S., Ning, Y., Lamb, A.N., and Bartley, J. (1999). Autosomal XX sex reversal caused by duplication of *SOX9*. *Am. J. Med. Genet.* 87, 349–353.

Hughes, I.A., Houk, C., Ahmed, S.F., and Lee, P.A. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *J. Pediatr. Urol.* 2, 148–162.

Igarashi, M., Takasawa, K., Hakoda, A., Kanno, J., Takada, S., Miyado, M., Baba, T., Morohashi, K.I., Tajima, T., Hata, K., et al. (2017). Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues. *Hum. Mutat.* 38, 39–42.

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

Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J.H., and Parker, K.L. (1995). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* *9*, 478–486.

Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T.J., Hentges, K.E., Zanaria, E., Lalli, E., Tamai, K.T., Sassone-Corsi, P., Lovell-Badge, R., Camerino, G., et al. (1996). Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: Potential links in endocrine development. *Mol. Endocrinol.* *10*, 1261–1272.

Imperato-Mcginley, J., Peterson, R.E., Gautier, T., and Sturla, E. (1979). Androgens and the Evolution of Male-Gender Identity among Male Pseudohermaphrodites with 5 α -Reductase Deficiency. *N. Engl. J. Med.* *300*, 1233–1237.

Imperato-McGinley, J., Ip, N.Y., Gautier, T., Neuweiler, J., Gruenspan, H., Liao, S., Chang, C., and Balazs, I. (1990). DNA linkage analysis and studies of the androgen receptor gene in a large kindred with complete androgen insensitivity. *Am. J. Med. Genet.* *36*, 104–108.

Inoue, M., Shima, Y., Miyabayashi, K., Tokunaga, K., Sato, T., Baba, T., Ohkawa, Y., Akiyama, H., Suyama, M., and Morohashi, K.I. (2016). Isolation and characterization of Fetal Leydig progenitor cells of male mice. *Endocrinology* *157*, 1222–1233.

Ipulan, L.A., Raga, D., Suzuki, K., Murashima, A., Matsumaru, D., Cunha, G., and Yamada, G. (2016). Investigation of sexual dimorphisms through mouse models and hormone/hormone-disruptor treatments. *Differentiation* *91*, 78–89.

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.

Jamin, S.P., Arango, N.A., Mishina, Y., Hanks, M.C., and Behringer, R.R. (2002). Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat. Genet.* *32*, 408–410.

Jan, S.Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D.G., Van Pelt, A.M.M., and Vormer, T.L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* *1822*, 1838–1850.

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.

Jeays-Ward, K., Hoyle, C., Brennan, J., Dandonneau, M., Alldus, G., Capel, B., and Swain, A. (2003). Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* *130*, 3663–3670.

Jeske, Y.W., Bowles, J., Greenfield, A., and Koopman, P. (1995). Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat. Genet.* *10*, 480–482.

Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S.P., Zhao, L., De Rooij, D.G., Themmen, A.P.N., Behringer, R.R., and Parker, K.L. (2004). Cell-specific knockout of steriodogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol. Endocrinol.* *18*, 1610–1619.

Jin, H., Won, M., Park, S.E., Lee, S., Park, M., and Bae, J. (2016). FOXL2 is an essential activator of SF-1-Induced transcriptional regulation of anti-müllerian hormone in human granulosa cells. *PLoS One* *11*, 1–13.

Josso, N., and Di Clemente, N. (2003). Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF- β family. *Trends Endocrinol. Metab.* *14*, 91–97.

Kabe, Y., Goto, M., Shima, D., Imai, T., Wada, T., Morohashi, K.I., Shirakawa, M., Hirose, S., and Handa, H. (1999). The role of human MBF1 as a transcriptional coactivator. *J. Biol. Chem.* *274*, 34196–34202.

Kaftanovskaya, E.M., Lopez, C., Ferguson, L., Myhr, C., and Agoulnik, A.I. (2015). Genetic ablation of androgen receptor signaling in fetal Leydig cell lineage affects Leydig cell functions in adult testis. *FASEB J.* *29*, 2327–2337.

Kaiser, U.B., Conn, P.M., and Chin, W.W. (1997). Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr. Rev.* *18*, 46–70.

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

Kashimada, K., Svingen, T., Feng, C., Pelosi, E., Bagheri-Fam, S., Harley, V.R., Schlessinger, D., Bowles, J., and Koopman, P. (2011). Antagonistic regulation of Cyp26b1 by transcription factors SOX9/SF1 and FOXL2 during gonadal development in mice. *FASEB J.* *25*, 3561–3569.

Kato, M., Das, S., Petras, K., Kitamura, K., Morohashi, K.I., Abuelo, D.N., Barr, M., Bonneau, D., Brady, A.F., Carpenter, N.J., et al. (2004). Mutations of ARX Are Associated with Striking Pleiotropy and Consistent Genotype-Phenotype Correlation. *Hum. Mutat.* *23*, 147–159.

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.I. (2005). Mouse Polycomb M33 is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating Ad4BP/SF1 expression. *Blood* *106*, 1612–1620.

Katoh-Fukui, Y., Miyabayashi, K., Komatsu, T., Owaki, A., Baba, T., Shima, Y., Kidokoro, T., Kanai, Y., Schedl, A., Wilhelm, D., et al. (2012). Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice. *Endocrinology* *153*, 913–924.

Kennedy, D., Ramsdale, T., Mattick, J., and Little, M. (1996). An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling. *12*, 329-31.

Kerr, J.B., and Knell, C.M. (1988). The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development 103*, 535–544.

Kilcoyne, K.R., Smith, L.B., Atanassova, N., Macpherson, S., McKinnell, C., Van Den Driesche, S., Jobling, M.S., Chambers, T.J.G., De Gendt, K., Verhoeven, G., et al. (2014). Fetal programming of adult Leydig cell function by androgenic effects on stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111*, E1924-E1932.

Kim, K., Liu, W., Cunha, G.R., Russell, D.W., Huang, H., Shapiro, E., and Baskin, L.S. (2002). Expression of the androgen receptor and 5 α -reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res. 307*, 145–153.

Kim, K.W., Li, S., Zhao, H., Peng, B., Tobet, S.A., Elmquist, J.K., Parker, K.L., and Zhao, L. (2010). CNS-specific ablation of steroidogenic factor 1 results in impaired female reproductive function. *Mol. Endocrinol. 24*, 1240–1250.

Kim, K.W., Zhao, L., Donato, J., Kohno, D., Xu, Y., Eliasa, C.F., Lee, C., Parker, K.L., and Elmquist, J.K. (2011). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108*, 10673–10678.

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.

Kim, Y., Bingham, N., Sekido, R., Parker, K.L., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2007). Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104*, 16558–16563.

Kitamura, K., Yanazawa, M., Sugiyama, N., Miura, H., Iizuka-Kogo, A., Kusaka, M., Omichi, K., Suzuki, R., Kato-Fukui, Y., Kamiirisa, K., et al. (2002). Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat. Genet. 32*, 359–369.

Klattig, J., Sierig, R., Kruspe, D., Besenbeck, B., and Englert, C. (2007a). Wilms' Tumor Protein Wt1 Is an Activator of the Anti-Müllerian Hormone Receptor Gene Amhr2. *Mol. Cell. Biol. 27*, 4355–4364.

Klattig, J., Sierig, R., Kruspe, D., Makki, M.S., and Englert, C. (2007b). WT1-mediated gene regulation in early urogenital ridge development. *Sex. Dev. 1*, 238–254.

Kobayashi, A., and Behringer, R.R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat. Rev. Genet. 4*, 969–980.

Kobayashi, A., Allison Stewart, C., Wang, Y., Fujioka, K., Thomas, N.C., Jamin, S.P., and Behringer, R.R. (2011). β -Catenin is essential for Müllerian duct regression during male sexual differentiation. *Development 138*, 1967–1975.

Kocer, A., Reichmann, J., Best, D., and Adams, I.R. (2009). Germ cell sex determination in mammals. *Mol. Hum. Reprod.* *15*, 205–213.

Koopman, P., Miinsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *348*, 450–452.

Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaffer, A.E., Hao, E., Shih, H.P., Seymour, P.A., Ma, J., and Sander, M. (2011). Sox9⁺ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development* *138*, 653–665.

Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Cape, 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.

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.

Krylova, I.N., Sablin, E.P., Moore, J., Xu, R.X., Waitt, G.M., MacKay, J.A., Juzumiene, D., Bynum, J.M., Madauss, K., Montana, V., et al. (2005). Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* *120*, 343–355.

Kulcenty, K., Holysz, M., and Trzeciak, W.H. (2015). SF-1 (NR5A1) expression is stimulated by the PKA pathway and is essential for the PKA-induced activation of LIPE expression in Y-1 cells. *Mol. Cell. Biochem.* *408*, 139–145.

Kumar, S., Chatzi, C., Brade, T., Cunningham, T.J., Zhao, X., and Duester, G. (2011). Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nat. Commun.* *2*, 151.

Kuroki, S., Matoba, S., Akiyoshi, M., Matsumura, Y., Miyachi, H., Mise, N., Abe, K., Ogura, A., Wilhelm, D., Koopman, P., et al. (2013). Epigenetic Regulation of Mouse Sex Determination by the Histone Demethylase Jmjd1a. *Science* (80-). *341*, 1106–1109.

Kuroki, S., Okashita, N., Baba, S., Maeda, R., Miyawaki, S., Yano, M., Yamaguchi, M., Kitano, S., Miyachi, H., Itoh, A., et al. (2017). Rescuing the aberrant sex development of H3K9 demethylase Jmjd1a-deficient mice by modulating H3K9 methylation balance. *PLoS Genet.* *13*, 1–22.

Kusaka, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Miyabayashi, K., Baba, T., Shima, Y., Sugiyama, N., Sugimoto, Y., Okuno, Y., Kodama, R., et al. (2010). Abnormal epithelial cell polarity and ectopic Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression induced in Emx2 KO Embryonic Gonads. *Endocrinology* *151*, 5893–5904.

Lai, P.Y., Wang, C.Y., Chen, W.Y., Kao, Y.H., Tsai, H.M., Tachibana, T., Chang, W.C., and Chung, B.C. (2011). Steroidogenic Factor 1 (NR5A1) resides in centrosomes and maintains genomic stability by controlling centrosome homeostasis. *Cell Death Differ.* *18*, 1836–1844.

- 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, 11–13.
- Lavery, R., Lardenois, A., Ranc-Jianmotamedi, F., Pauper, E., Gregoire, E.P., Vigier, C., Moreilhon, C., Primig, M., and Chaboissier, M.C. (2011). XY Sox9 embryonic loss-of-function mouse mutants show complete sex reversal and produce partially fertile XY oocytes. *Dev. Biol.* 354, 111–122.
- 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., and Hage, W.J. (1994). Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found. Symp.* 182, 68–84.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., and Hogan, B.L.M. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13, 424–436.
- Lécureuil, C., Fontaine, I., Crepieux, P., and Guillou, F. (2002). Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* 33, 114–118.
- Lee, Y.K., Parker, K.L., Choi, H.S., and Moore, D.D. (1999). Activation of the promoter of the orphan receptor SHP by orphan receptors that bind DNA as monomers. *J. Biol. Chem.* 274, 20869–20873.
- 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.
- Lei, Z.M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X., and Rao, C. V. (2001). Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 15, 184–200.
- Lewis, A.E., Rusten, M., Hoivik, E.A., Vikse, E.L., Hansson, M.L., Wallberg, A.E., and Bakke, M. (2008). Phosphorylation of steroidogenic factor 1 is mediated by cyclin-dependent kinase 7. *Mol. Endocrinol.* 22, 91–104.
- Li, L.A., Chiang, E.F.L., Chen, J.C., Hsu, N.C., Chen, Y.J., and Chung, B.C. (1999). Function of steroidogenic factor 1 domains in nuclear localization, transactivation, and interaction with transcription factor TFIIB and c-Jun. *Mol. Endocrinol.* 13, 1588–1598.
- Li, Y., Choi, M., Cavey, G., Daugherty, J., Suino, K., Kovach, A., Bingham, N.C., Kliewer, S.A., and Xu, H.E. (2005). Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1. *Mol. Cell* 17, 491–502.

Li, Y., Zheng, M., and Lau, Y.F.C. (2014). The sex-determining factors SRY and SOX9 regulate similar target genes and promote testis cord formation during testicular differentiation. *Cell Rep.* 8, 723–733.

Liang, J., Wang, N., He, J., Du, J., Guo, Y., Li, L., Wu, W., Yao, C., Li, Z., and Kee, K. (2019). Induction of sertoli-like cells from human fibroblasts by *nr5a1* and *gata4*. *Elife* 8, 1–27.

Lindeman, R.E., Gearhart, M.D., Minkina, A., Krentz, A.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2015). Sexual cell-fate reprogramming in the ovary by DMRT1. *Curr. Biol.* 25, 764–771.

Little, T.H., Zhang, Y., Matulis, C.K., Weck, J., Zhang, Z., Ramachandran, A., Mayo, K.E., and Radhakrishnan, I. (2006). Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: A helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Mol. Endocrinol.* 20, 831–843.

Liu, C., Rodriguez, K., and Yao, H.H.C. (2016). Mapping lineage progression of somatic progenitor cells in the mouse fetal testis. *Dev.* 143, 3700–3710.

Liu, C.F., Parker, K., and Humphrey, Y. (2010). WNT4/ β -catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin β B in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 5, e10382.

Liu, H., Yang, Y., Zhang, L., Liang, R., Ge, R.S., Zhang, Y., Zhang, Q., Xiang, Q., Huang, Y., and Su, Z. (2014). Basic fibroblast growth factor promotes stem Leydig cell development and inhibits LH-stimulated androgen production by regulating microRNA expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144, 483–491.

Liu, J., Willet, S., Bankaitis, E., Xu, Y., Wright, C., and Gu, G. (2013). Non-parallel recombination limits Cre-LoxP-based reporters as precise indicators of conditional genetic manipulation. *Genesis* 51, 436–442.

Liu, S., Downes, M., and Evans, R.M. (2015). Metabolic Regulation by Nuclear Receptors. *Innov. Med.* 25–37.

Lopez, D., Shea-Eaton, W., and McLean, M.P. (2001). Characterization of a steroidogenic factor-1-binding site found in promoter of sterol carrier protein-2 gene. *Endocrine* 14, 253–261.

Lu, H., Zhang, C., Hu, Y., Qin, H., Gu, A., Li, Y., Zhang, L., Li, Z., and Wang, Y. (2016). MiRNA-200c mediates mono-butyl phthalate-disrupted steroidogenesis by targeting vimentin in Leydig tumor cells and murine adrenocortical tumor cells. *Toxicol. Lett.* 241, 95–102.

Lu, Y., Anderson, W.R., Zhang, H., Feng, S., and Pick, L. (2013). Functional conservation of *Drosophila* FTZ-F1 and its mammalian homologs suggests ligand-independent regulation of NR5A family transcriptional activity. *Dev. Genes Evol.* 223, 199–205.

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.

Lukanova, A., and Kaaks, R. (2005). Endogenous hormones and ovarian cancer: Epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 98–107.

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.

Lyon, M.F., and Hawkes, S.G. (1970). X-linked Gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 227, 1217–1219.

Ma, X., Dong, Y., Matzuk, M.M., and Kumar, T.R. (2004). Targeted disruption of luteinizing hormone β -subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17294–17299.

Maatouk, D.M., Dinapoli, L., Alvers, A., Parker, K.L., Taketo, M.M., and Capel, B. (2008). Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2949–2955.

Maatouk, D.M., Mork, L., Hinson, A., Kobayashi, A., McMahon, A.P., and Capel, B. (2012). Germ Cells Are Not Required to Establish the Female Pathway in Mouse Fetal Gonads. *PLoS One* 7, 1–7.

Maatouk, D.M., Mork, L., Chassot, A.A., Chaboissier, M.C., and Capel, B. (2013). Disruption of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa cells in the perinatal Wnt4 mutant ovary. *Dev. Biol.* 383, 295–306.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.

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.

Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R.L., McGarry, J.D., and Parker, K.L. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143, 607–614.

Malikova, J., Camats, N., Fernández-Cancio, M., Heath, K., González, I., Caimarí, M., Campo, M. Del, Albisu, M., Kolouskova, S., Audí, L., et al. (2014). Human NR5A1/SF-1 mutations show decreased activity on BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), an important regulator of energy balance: Testing impact of novel SF-1 mutations beyond steroidogenesis. *PLoS One* 9, e104838.

Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Méjean, 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.

Mallol, A., Guirola, M., and Payer, B. (2019). PRDM14 controls X-chromosomal and global epigenetic reprogramming of H3K27me3 in migrating mouse primordial germ cells. *Epigenetics and Chromatin* 12, 1–10.

Manuylov, N.L., Smagulova, F.O., Leach, L., and Tevosian, S.G. (2008). Ovarian development in mice requires the GATA4-FOG2 transcription complex. *Development* 135, 3731–3743.

Manuylov, N.L., Zhou, B., Ma, Q., Fox, S.C., Pu, W.T., and Tevosian, S.G. (2011). Conditional ablation of Gata4 and Fog2 genes in mice reveals their distinct roles in mammalian sexual differentiation. *Dev. Biol.* 353, 229–241.

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, 101–105.

Mayerhofer, A., LAhr, G., Seidl, K., Eusterschulte, B., Christoph, A., and Gratzl, M. (1996). The neural cell adhesion molecule (NCAM) provides clues to the development of testicular Leydig cells. *J. Androl.* 17, 223–230.

McGill, G., Shimamura, A., Bates, R.C., Savage, R.E., and Fisher, D.E. (1997). Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 138, 901–911.

McPhaul, M.J. (2002). Androgen receptor mutations and androgen insensitivity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 198, 61–67.

Meeks, J.J., Weiss, J., and Jameson, J.L. (2003a). Dax1 is required for testis determination. *Nat. Genet.* 34, 32–33.

Meeks, J.J., Crawford, S.E., Russell, T.A., Morohashi, K.I., Weiss, J., and Jameson, J.L. (2003b). Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development* 130, 1029–1036.

Meinsohn, M.C., Smith, O.E., Bertolin, K., and Murphy, B.D. (2019). The orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1: Structure, regulation, and essential roles in mammalian reproduction. *Physiol. Rev.* 99, 1249–1279.

Middendorff, R., Davidoff, M., and Holstein, A.F. (1993). Neuroendocrine marker substances in human Leydig cells — changes by disturbances of testicular function. *Andrologia* 25, 257–262.

Miller, W.L., and Auchus, R.J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* 32, 81–151.

Miller WL (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9, 295–318.

Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M.J., Matzuk, M.M., Josso, N., Cate, R.L., and Behringer, R.R. (1996). Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* *10*, 2577–2587.

Miyabayashi, K., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Baba, T., Shima, Y., Sugiyama, N., Kitamura, K., and Morohashi, K. ichirou (2013). Aristaless Related Homeobox Gene, *Arx*, Is Implicated in Mouse Fetal Leydig Cell Differentiation Possibly through Expressing in the Progenitor Cells. *PLoS One* *8*, e68050.

Miyagawa, S., Satoh, Y., Haraguchi, R., Suzuki, K., Iguchi, T., Taketo, M.M., Nakagata, N., Matsumoto, T., Takeyama, K.I., Kato, S., et al. (2009). Genetic interactions of the androgen and Wnt/ β -catenin pathways for the masculinization of external genitalia. *Mol. Endocrinol.* *23*, 871–880.

Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I., and Aizawa, S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* *124*, 1653–1664.

Miyamoto, Y., Taniguchi, H., Hamel, F., Silversides, D.W., and Viger, R.S. (2008). A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol. Biol.* *9*, 1–18.

Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Oki, M., Umezawa, A., et al. (2010). Identification of a novel distal control region upstream of the human Steroidogenic Acute Regulatory Protein (*StAR*) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J. Biol. Chem.* *285*, 28240–28251.

Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., et al. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* *130*, 4279–4286.

Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., Marzi, L., Cohen-Solal, A., Georg, I., Klattig, J., et al. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* *136*, 1813–1821.

Moniot, B., Ujjan, S., Champagne, J., Hirai, H., Aritake, K., Nagata, K., Dubois, E., Nidelet, S., Nakamura, M., Urade, Y., et al. (2014). Prostaglandin D2 acts through the Dp2 receptor to influence male germ cell differentiation in the foetal mouse testis. *Dev.* *141*, 3561–3571.

Monteiro, J.B., Colón-Díaz, M., García, M., Gutierrez, S., Colón, M., Seto, E., Laboy, J., and Flores, I. (2014). Endometriosis is characterized by a distinct pattern of histone 3 and histone 4 lysine modifications. *Reprod. Sci.* *21*, 305–318.

Moore, A.W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N.D., and Schedl, A. (1999). YAC complementation shows a requirement for *Wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* *126*, 1845–1857.

Morais, S., Hacker, A., Harleym, V., Goodfellow, P., Swain, A., Lovell-badge, R., and Hill, M. (1996). Differentiation in Mammals and Birds. *14*.

Morohashi, K.I. (1997). The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes to Cells* 2, 95–106.

Morohashi, K., and Omura, T. (1996). Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J.* 10, 1569–1577.

Morohashi, K., Baba, T., and Tanaka, M. (2013). Steroid hormones and the development of reproductive organs. *Sex. Dev.* 7, 61–79.

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

Moses, M.M., and Behringer, R.R. (2019). A gene regulatory network for Müllerian duct regression. *Environ. Epigenetics* 5, 1–7.

Mullen, R.D., Wang, Y., Liu, B., Moore, E.L., and Behringer, R.R. (2018). Osterix functions downstream of anti-Müllerian hormone signaling to regulate Müllerian duct regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 8382–8387.

Munsterberg, A., and Lovell-Badge, R. (1991). Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113, 613–624.

Murashima, A., Kishigami, S., Thomson, A., and Yamada, G. (2015). Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1849, 163–170.

Nachtigal, M.W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D.L., Flanagan, J.N., Hammer, G.D., and Ingraham, H.A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93, 445–454.

Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1993). RARs and RXRs: Evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* 12, 2349–2360.

de Napoles, M., Nesterova, T., and Brockdorff, N. (2007). Early loss of Xist RNA expression and inactive X chromosome associated chromatin modification in developing primordial germ cells. *PLoS One* 2, 9–14.

Nef, S., and Parada, L.F. (1999). Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat. Genet.* 22, 295–299.

Nicol, B., and Yao, H.H.C. (2015). Gonadal identity in the absence of pro-testis factor SOX9 and pro-ovary factor beta-catenin in mice. *Biol. Reprod.* 93, 1–12.

Nicol, B., Rodriguez, K., and Yao, H.H. (2020). Aberrant and constitutive expression of FOXL2 impairs ovarian development and functions in mice. *Biol. Reprod.* 1–12.

Nishino, K., Hattori, N., Tanaka, S., and Shiota, K. (2004). DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *J. Biol. Chem.* 279, 22306–22313.

O’Shaughnessy, P.J., Baker, P.J., Heikkilä, M., Vainio, S., and McMahon, A.P. (2000). Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis - Androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal Leydig cells. *Endocrinology* 141, 2631–2637.

Ohinata, Y., Payer, B., O’Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., et al. (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.

Orvis, G.D., Jamin, S.P., Kwan, K.M., Mishina, Y., Kaartinen, V.M., Huang, S., Roberts, A.B., Umans, L., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., et al. (2008). Functional redundancy of TGF-beta family type I receptors and receptor-smads in mediating anti-müllerian hormone-induced müllerian duct regression in the mouse. *Biol. Reprod.* 78, 994–1001.

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.

Pailhoux, E., Vigier, B., Vaiman, D., Serval, N., Chaffaux, S., Cribiu, E.P., and Cotinot, C. (2002). Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Dev. Dyn.* 224, 39–50.

Park, M., Shin, E., Won, M., Kim, J.H., Go, H., Kim, H.L., Ko, J.J., Lee, K., and Bae, J. (2010). FOXL2 interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced CYP17 transcription in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 24, 1024–1036.

Park, S.Y., Meeks, J.J., Raverot, G., Pfaff, L.E., Weiss, J., Hammer, G.D., and Jameson, J.L. (2005). Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development* 132, 2415–2423.

Park, S.Y., Lee, E.J., Emge, D., Jahn, C.L., and Jameson, J.L. (2008). A phenotypic spectrum of sexual development in Dax1 (Nr0b1)-deficient mice: consequence of the C57BL/6J strain on sex determination. *Biol. Reprod.* 79, 1038–1045.

Park, Y.Y., Park, K.C., Shong, M., Lee, S.J., Lee, Y.H., and Choi, H.S. (2007). EID-1 interacts with orphan nuclear receptor SF-1 and represses its transactivation. *Mol. Cells* 24, 372–377.

- Parker, K.L., and Schimmer, B.P. (1997). Steroidogenic factor 1: a key mediator of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* *18*, 361–377.
- Parker, M.G., and White, R. (1996). Nuclear receptors spring into action. *Nat. Struct. Biol.* *3*, 113–115.
- 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.
- Parr, B.A., and McMahon, A.P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* *395*, 707–710.
- Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2012). General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* *12*, 486–504.
- Pelletier, J., Bruening, W., Kashtan, C.E., Mauer, S.M., Manivel, J.C., Striegel, J.E., Houghton, D.C., Junien, C., Habib, R., Fouser, L., et al. (1991). Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in denys-drash syndrome. *Cell* *67*, 437–447.
- Pelusi, C., Ikeda, Y., Zubair, M., and Parker, K.L. (2008). Impaired follicle development and infertility in female mice lacking steroidogenic factor 1 in ovarian granulosa cells. *Biol. Reprod.* *79*, 1074–1083.
- Picard, J.Y., Cate, R.L., Racine, C., and Josso, N. (2017). The Persistent Müllerian Duct Syndrome: An Update Based Upon a Personal Experience of 157 Cases. *Sex. Dev.* *11*, 109–125.
- Pierucci-Alves, F., Clark, A.M., and Russell, L.D. (2001). A Developmental Study of the Desert Hedgehog-Null Mouse Testis1. *Biol. Reprod.* *65*, 1392–1402.
- 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 11. *Biol. Reprod.* *68*, 1098–1106.
- Pitetti, J.L., Calvel, P., Romero, Y., Conne, B., Truong, V., Papaioannou, M.D., Schaad, O., Docquier, M., Herrera, P.L., Wilhelm, D., et al. (2013). Insulin and IGF1 Receptors Are Essential for XX and XY Gonadal Differentiation and Adrenal Development in Mice. *PLoS Genet.* *9*, e1003160.
- Polanco, J.C., Wilhelm, D., Davidson, T.L., Knight, D., and Koopman, P. (2009). Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: Implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 506–516.
- Qin, Y., and Bishop, C.E. (2005). Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 1221–1229.

Rafal P. Piprek, Malgorzata Kloc, and J.Z.K. (2016). Early Development of the Gonads: Origin and Differentiation of the Somatic Cells of the Genital Ridges. *Mol. Mech. Cell Differ. Gonad Dev.* 58, 309–336.

Ramayya, M.S., Sheng, M., Moroz, K., Hill, S.M., and Rowan, B.G. (2010). Human steroidogenic factor-1 (hSF-1) regulates progesterone biosynthesis and growth of ovarian surface epithelial cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 119, 14–25.

Rantakari, P., Lagerbohm, H., Kaimainen, M., Suomela, J.P., Strauss, L., Sainio, K., Pakarinen, P., and Poutanen, M. (2010). Hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 12 is essential for mouse organogenesis and embryonic survival. *Endocrinology* 151, 1893–1901.

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.

Rebourcet, D., O’Shaughnessy, P.J., Pitetti, J.L., Monteiro, A., O’Hara, L., Milne, L., Tsai, Y.T., Cruickshanks, L., Riethmacher, D., Guillou, F., et al. (2014). Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult leydig cell development in the prepubertal testis. *Dev.* 141, 2139–2149.

Richardson, N., Gillot, I., Gregoire, E.P., Youssef, S.A., de Rooij, D., de Bruin, A., De Cian, M.C., and Chaboissier, M.C. (2020). *Sox8* and *sox9* act redundantly for ovarian-to-testicular fate reprogramming in the absence of *r-spondin1* in mouse sex reversals. *Elife* 9, 1–19.

Robinson-Rechavi, M., Garcia, H.E., and Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.* 116, 585–586.

Rogers, M.A., Liu, J., Song, B.L., Li, B.L., Chang, C.C.Y., and Chang, T.Y. (2015). Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): Enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 151, 102–107.

Roshani, L., Fujioka, K., Auer, G., Kjellman, M., Lagercrantz, S., and Larsson, C. (2002). Aberrations of centrosomes in adrenocortical tumors. *Int. J. Oncol.* 20, 1161–1165.

Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., and Wylie, C. (2006). Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 133, 4861–4869.

Saba, R., Kato, Y., and Saga, Y. (2014). NANOS2 promotes male germ cell development independent of meiosis suppression. *Dev. Biol.* 385, 32–40.

Sablin, E.P., Blind, R.D., Krylova, I.N., Ingraham, J.G., Cai, F., Williams, J.D., Fletterick, R.J., and Ingraham, H.A. (2009). Structure of SF-1 bound by different phospholipids: Evidence for regulatory ligands. *Mol. Endocrinol.* 23, 25–34.

Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., and Milbrandt, J. (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 10939–10943.

Saitou, M. (2002). A molecular programme for the germ line specification in mice. *Nature* *418*, 293–300.

Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* *139*, 15–31.

de Santa Barbara, P., Méjean, C., Moniot, B., Malclès, M.-H., Berta, P., and Boizet-Bonhoure, B. (2001). Steroidogenic Factor-1 Contributes to the Cyclic-Adenosine Monophosphate Down-Regulation of Human SRY Gene Expression¹. *Biol. Reprod.* *64*, 775–783.

De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., and Berta, P. (1998). Direct Interaction of SRY-Related Protein SOX9 and Steroidogenic Factor 1 Regulates Transcription of the Human Anti-Müllerian Hormone Gene. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6653–6665.

Sasaki, H., and Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 129–140.

Schena, M., and Yamamoto, K.R. (1988). Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast. *Science* (80-.). *241*, 965–967.

Schepers, G., Wilson, M., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2003). Sox8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* *278*, 28101–28108.

Schimmer, B.P., and White, P.C. (2010). Minireview: Steroidogenic factor 1: Its roles in differentiation, development, and disease. *Mol. Endocrinol.* *24*, 1322–1337.

Schlaubitz, S., Yatsenko, S., Smith, L., Keller, K., Vissers, L., Scott, D., Wen cai, W., Reardon, W., Abdul-rahman, O., Lammer, E., et al. (2007). Ovotestes and XY Sex Reversal in a Female With an Interstitial 9q33.3-q34.1 Deletion Encompassing NR5A1 and LMX1B Causing Features of Genitopatellar Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *143*, 1071–1081.

Schmahl, J., Eicher, E.M., Washburn, L.L., and Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* *127*, 65–73.

Schmahl, J., Kim, Y., Colvin, J.S., Ornitz, D.M., and Capel, B. (2004). Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* *131*, 3627–3636.

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.

- Schuettengruber, B., and Cavalli, G. (2009). Recruitment of Polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* *136*, 3531–3542.
- Schüle, K.M., Leichsenring, M., Andreani, T., Vastolo, V., Mallick, M., Musheev, M.U., Karaulanov, E., and Niehrs, C. (2019). GADD45 promotes locus-specific DNA demethylation and 2C cycling in embryonic stem cells. *Genes Dev.* *33*, 782–798.
- Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C., Thienpont, B., Dean, W., and Reik, W. (2012). The Dynamics of Genome-wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells. *Mol. Cell* *48*, 849–862.
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., and Matsui, Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.* *278*, 440–458.
- Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., Saga, Y., Tachibana, M., Shinkai, Y., and Saitou, M. (2007). Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* *134*, 2627–2638.
- 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.
- Shaffer, P.L., McDonnell, D.P., and Gwirth, D.T. (2005). Characterization of transcriptional activation and DNA-binding functions in the hinge region of the vitamin D receptor. *Biochemistry* *44*, 2678–2685.
- She, Z.Y., and Yang, W.X. (2017). Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development? *Semin. Cell Dev. Biol.* *63*, 13–22.
- Shen, W.H., Moore, C.C.D., Ikeda, Y., Parker, K.L., and Ingraham, H.A. (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade. *Cell* *77*, 651–661.
- Shima, Y. (2019). Development of fetal and adult Leydig cells. *Reprod. Med. Biol.* *18*, 323–330.
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguichi, S., Arakawa, T., Akiyama, H., Tachibana, T., Tsutsui, K., and Morohashi, K. (2013). Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes. *Mol. Endocrinol.* *27*, 63–73.
- Shima, Y., Matsuzaki, S., Miyabayashi, K., Otake, H., Baba, T., Kato, S., Huhtaniemi, I., and Morohashi, K.I. (2015). Fetal leydig cells persist as an androgen-independent subpopulation in the postnatal testis. *Mol. Endocrinol.* *29*, 1581–1593.
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Doi, M., Okamura, H., and Suzuki, K. (2018). Fetal leydig cells dedifferentiate and serve as adult leydig stem cells. *Dev.* *145*, 1–13.

Shimamura, R., Fraizer, G.C., Trapman, J., Lau, Y.F.C., and Saunders, G.F. (1997). The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin. Cancer Res.* 3, 2571–2580.

van Silfhout, A., Boot, A.M., Dijkhuizen, T., Hoek, A., Nijman, R., Sikkema-Raddatz, B., and van Ravenswaaij-Arts, C.M.A. (2009). A unique 970 kb microdeletion in 9q33.3, including the NR5A1 gene in a 46,XY female. *Eur. J. Med. Genet.* 52, 157–160.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A., Lovell-badge, R., Goodfellow, P.N., et al. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Chromosom. Res.* 346, 239–245.

Singh, A.P., Cummings, C.A., Mishina, Y., and Archer, T.K. (2013). SOX8 Regulates Permeability of the Blood-Testes Barrier That Affects Adult Male Fertility in the Mouse1. *Biol. Reprod.* 88, 1–8.

Sirianni, R., Chimento, A., Malivindi, R., Mazzitelli, I., Andò, S., and Pezzi, V. (2007). Insulin-like growth factor-I, regulating aromatase expression through steroidogenic factor 1, supports estrogen-dependent tumor leydig cell proliferation. *Cancer Res.* 67, 8368–8377.

Skafar, D.F., and Zhao, C. (2008). The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine* 33, 1–8.

Skinner, M.K., Tung, P.S., and Fritz, I.B. (1985). Cooperativity between sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J. Cell Biol.* 100, 1941–1947.

Sock, E., Schmidt, K., Hermanns-Borgmeyer, I., Bösl, M.R., and Wegner, M. (2001). Idiopathic Weight Reduction in Mice Deficient in the High-Mobility-Group Transcription Factor Sox8. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6951–6959.

Spiller, C., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2009). Cell cycle analysis of fetal germ cells during sex differentiation in mice. *Biol. Cell* 101, 587–598.

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev. Biol.* 1, 1–8.

Stallings, N.R., Hanley, N.A., Majdic, G., Zhao, L., Bakke, M., and Parker, K.L. (2002). Development of a transgenic green fluorescent protein lineage marker for steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 16, 2360–2370.

Stévant, I., and Nef, S. (2019). Genetic Control of Gonadal Sex Determination and Development. *Trends Genet.* 35, 346–358.

Stévant, I., Neirijnck, Y., Borel, C., Escoffier, J., Smith, L.B., Antonarakis, S.E., Dermitzakis, E.T., and Nef, S. (2018). Deciphering Cell Lineage Specification during Male Sex Determination with Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Rep.* 22, 1589–1599.

Stévant, I., Kühne, F., Greenfield, A., Chaboissier, M.C., Dermitzakis, E.T., and Nef, S. (2019). Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep.* 26, 3272–3283

Straume, A.H., Løvås, K., Miletic, H., Gravdal, K., Lønning, P.E., and Knappskog, S. (2012). Elevated levels of the steroidogenic factor 1 are associated with over-expression of CYP19 in an oestrogen-producing testicular Leydig cell tumour. *Eur. J. Endocrinol.* 166, 941–949.

Sumi, E., Iehara, N., Akiyama, H., Matsubara, T., Mima, A., Kanamori, H., Fukatsu, A., Salant, D.J., Kita, T., Arai, H., et al. (2007). SRY-related HMG box 9 regulates the expression of Col4a2 through transactivating its enhancer element in mesangial cells. *Am. J. Pathol.* 170, 1854–1864.

Sutton, E., Hughes, J., White, S., Sekido, R., Tan, J., Arboleda, V., Rogers, N., Knowler, K., Rowley, L., Eyre, H., et al. (2011). Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 121, 328–341.

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

Suzuki, A., Igarashi, K., Aisaki, K.I., 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, T., Kasahara, M., Yoshioka, H., Umesono, K., and Morohashi, K. (2003). LXXLL motifs in DAX-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. *Endocr. Res.* 23, 238–249.

Svingen, T., and Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: Origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27, 2409–2426.

Syed, V., Ulinski, G., Mok, S.C., Yiu, G.K., and Ho, S.M. (2001). Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res.* 61, 6768–6776.

Takeda, H., and Chang, C. (1991). Immunohistochemical and in-situ hybridization analysis of androgen receptor expression during the development of the mouse prostate gland. *J. Endocrinol.* 129, 83–89.

Takekawa, M., and Saito, H. (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95, 521–530.

Taketo, M., Parker, K.L., Howard, I.I.T.A., Tsukiyama, I.T., Wong, M., Niwa, O., Morton, C.C., Miron, P.M., and Seldin, M.F. (1995). Homologs of *Drosophila* Fushi-Tarazu Factor 1 Map to Mouse Chromosome 2 and Human Chromosome 9q33. *Genomics* 25, 565–567.

Tam, P.P.L., and Snow, M. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *64*, 133–147.

Tanaka, S.S., and Nishinakamura, R. (2014). Regulation of male sex determination: Genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 4781–4802.

Tang, F., Richardson, N., Albina, A., Chaboissier, M.C., and Perea-Gomez, A. (2020). Mouse Gonad Development in the Absence of the Pro-Ovary Factor WNT4 and the Pro-Testis Factor SOX9. *Cells* *9*, 1103.

Tang, H., Brennan, J., Karl, J., Hamada, Y., Raetzman, L., and Capel, B. (2008). Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Development* *135*, 3745–3753.

Tanner, T.M., Denayer, S., Geverts, B., Tilborgh, N. Van, Kerkhofs, S., Helsen, C., Spans, L., Dubois, V., Houtsmuller, A.B., Claessens, F., et al. (2010). A 629RKLKK633 motif in the hinge region controls the androgen receptor at multiple levels. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 1919–1927.

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.

Tian, Y., Kong, B., Zhu, W., Su, S., and Kan, Y. (2009). Expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in endometriosis is Associated with endometriosis severity. *J. Int. Med. Res.* *37*, 1389–1395.

Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., Yoshitome, A., Yamawaki, K., Amagai, M., Inoue, A., et al. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1278–1291.

Tran, P. V., Lee, M.B., Marín, O., Xu, B., Jones, K.R., Reichardt, L.F., Rubenstein, J.R., and Ingraham, H.A. (2003). Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *22*, 441–453.

Tremblay, J.J., and Viger, R.S. (1999). Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol. Endocrinol.* *13*, 1388–1401.

Tremblay, J.J., Robert, N.M., and Viger, R.S. (2001a). Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Müllerian inhibiting substance gene transcription in sertoli cells. *Mol. Endocrinol.* *15*, 1636–1650.

Tremblay, K.D., Dunn, N.R., and Robertson, E.J. (2001b). Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* *128*, 3609–3621.

Truttmann, A.C., Ginet, V., and Puyal, J. (2020). Current Evidence on Cell Death in Preterm Brain Injury in Human and Preclinical Models. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 1–26.

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 (80-.)*. 301, 1239–1241.

Tsuji, M., Shima, H., Terada, N., and Cunha, G.R. (1994). 5 alpha-reductase activity in developing urogenital tracts of fetal and neonatal male mice. *Endocrinology* 134, 2198–2205.

Tung, P.S., Skinner, M.K., and Fritz, I.B. (1984). Cooperativity between Sertoli Cells and Peritubular Myoid Cells in the Formation of the Basal Lamina in the Seminiferous Tubule. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 438, 435–446.

Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J.E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco, A., Cao, A., Schlessinger, D., and Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1171–1181.

Ueda, H., Sun, G.C., Murata, T., and Hirose, S. (1992). A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5667–5672.

Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., et al. (2009). Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* 139, 1130–1142.

Ulu, F., Kim, S.M., Yokoyama, T., and Yamazaki, Y. (2017). Dose-dependent functions of fibroblast growth factor 9 regulate the fate of murine XY primordial germ cells. *Biol. Reprod.* 96, 122–133.

Urs, A.N., Dammer, E., and Sewer, M.B. (2006). Sphingosine regulates the transcription of CYP17 by binding to steroidogenic factor-1. *Endocrinology* 147, 5249–5258.

Ute Herzer , Alexander Crocoll , Debra Barton, N.H. (1999). The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen. *Curr. Biol.* 837–841.

Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., and McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397, 405–409.

Vasquez, Y.M., Wu, S.P., Anderson, M.L., Hawkins, S.M., Creighton, C.J., Ray, M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Lydon, J.P., and DeMayo, F.J. (2016). Endometrial expression of steroidogenic factor 1 promotes cystic glandular morphogenesis. *Mol. Endocrinol.* 30, 518–532.

Vernet, N., Condrea, D., Mayere, C., Féret, B., Klopfenstein, M., Magnant, W., Alunni, V., Telentin, M., Souali-Crespo, S., Nef, S., et al. (2020). Meiosis occurs normally in the fetal ovary of mice lacking all retinoic acid receptors. *Sci. Adv.* 6, eaaz1139.

Vidal, V., and Schedl, A. (2000). Requirement of WT1 for gonad and adrenal development: insights from transgenic animals. *Endocr. Res.* 26, 1075–1082.

Vidal, V.P.I., Chaboissier, M.C., De Rooij, D.G., and Schedl, A. (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28, 216–217.

Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantès, J., Bricarelli, F.D., Keutel, J., Hustert, E., et al. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79, 1111–1120.

Wang, C.-Y., Kao, Y.-H., Lai, P.-Y., Chen, W.-Y., and Chung, B. (2013a). Steroidogenic Factor 1 (NR5A1) Maintains Centrosome Homeostasis in Steroidogenic Cells by Restricting Centrosomal DNA-Dependent Protein Kinase Activation. *Mol. Cell. Biol.* 33, 476–484.

Wang, C.Y., Chen, W.Y., Lai, P.Y., and Chung, B. chu (2013b). Distinct functions of steroidogenic factor-1 (NR5A1) in the nucleus and the centrosome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 371, 148–153.

Wang, C.Y., Lai, P.Y., Chen, T.Y., and Chung, B.-C. (2014). NR5A1 prevents centriole splitting by inhibiting centrosomal DNA-PK activation and β -catenin accumulation. *Cell Commun. Signal.* 12, 1–9.

Wärnmarkt, A., Almlöf, T., Leers, J., Gustafsson, J.Å., and Treuter, E. (2001). Differential Recruitment of the Mammalian Mediator Subunit TRAP220 by Estrogen Receptors ER α and ER β . *J. Biol. Chem.* 276, 23397–23404.

Warr, N., Carre, G.A., Siggers, P., Faleato, J.V., Brixey, R., Pope, M., Bogani, D., Childers, M., Wells, S., Scudamore, C.L., et al. (2012). Gadd45 γ and Map3k4 Interactions Regulate Mouse Testis Determination via p38 MAPK-Mediated Control of Sry Expression. *Dev. Cell* 23, 1020–1031.

Weikum, E.R., Liu, X., and Ortlund, E.A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci.* 27, 1876–1892.

Weiss, J., Meeks, J.J., Hurley, L., Raverot, G., Frassetto, A., and Jameson, J.L. (2003). Sox3 Is Required for Gonadal Function, but Not Sex Determination, in Males and Females. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8084–8091.

Welsh, M., Moffat, L., Jack, L., McNeilly, A., Brownstein, D., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M., and Smith, L.B. (2010). Deletion of androgen receptor in the smooth muscle of the seminal vesicles impairs secretory function and alters its responsiveness to exogenous testosterone and estradiol. *Endocrinology* 151, 3374–3385.

Welsh, M., Moffat, L., McNeilly, A., Brownstein, D., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M., and Smith, L.B. (2011). Smooth muscle cell-specific knockout of androgen receptor: A new model for prostatic disease. *Endocrinology* 152, 3541–3551.

Welsh, M., Suzuki, H., and Yamada, G. (2014). The masculinization programming window. *Endocr. Dev.* 27, 17–27.

Wen, Q., Wang, Y., Tang, J., Cheng, C.Y., and Liu, Y.X. (2016). Sertoli cell Wt1 regulates peritubular myoid cell and fetal leydig cell differentiation during fetal testis development. *PLoS One* 11, 1–18.

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.

Wilhelm, D., and Englert, C. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 16, 1839–1851.

Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M.J., Combes, A.N., Beverdam, A., Bowles, J., Mizusaki, H., and Koopman, P. (2005). Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* 287, 111–124.

Wilhelm, D., Hiramatsu, R., Mizusaki, H., Widjaja, L., Combes, A.N., Kanai, Y., and Koopman, P. (2007). SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *J. Biol. Chem.* 282, 10553–10560.

Wilhelm, D., Washburn, L.L., Truong, V., Fellous, M., Eicher, E.M., and Koopman, P. (2009). Antagonism of the testis- and ovary-determining pathways during ovotestis development in mice. *Mech. Dev.* 126, 324–336.

Wilson, T.E., Fahrner, T.J., and Milbrandt, J. (1993). The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5794–5804.

Xue, Q., Lin, Z., Yin, P., Milad, M.P., Cheng, Y.H., Confino, E., Reierstad, S., and Bulun, S.E. (2007). Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3261–3267.

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.

Yamagata, Y., Nishino, K., Takaki, E., Sato, S., Maekawa, R., Nakai, A., and Sugino, N. (2014). Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLoS One* 9, 1–11.

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.

Yao, H.H.C., 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.C., 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.

Yao, H.H.C., Aardema, J., and Holthausen, K. (2006). Sexually dimorphic regulation of inhibin beta B in establishing gonadal vasculature in mice. *Biol. Reprod.* 74, 978–983.

Yarbrough, W.G., Quarmby, V.E., Simental, J.A., Joseph, D.R., Sar, M., Lubahn, D.B., Olsen, K.L., French, F.S., and Wilson, E.M. (1990). A single base mutation in the androgen receptor gene causes androgen insensitivity in the testicular feminized rat. *J. Biol. Chem.* *265*, 8893–8900.

Yeh, S., Tsai, M.-Y., Xu, Q., Mu, X.-M., Lardy, H., Huang, K.-E., Lin, H., Yeh, S., Altuwaiji, S., Zhou, X., et al. (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15245–15250.

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.

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.

Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, Y., and Chambon, P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* *11*, 3681–3694.

Zhang, F.P., Poutanen, M., Wilbertz, J., and Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol. Endocrinol.* *15*, 172–183.

Zhang, J., Zhang, M., Acampora, D., Vojtek, M., Yuan, D., Simeone, A., and Chambers, I. (2018). OTX2 restricts entry to the mouse germline. *Nature* *562*, 595–599.

Zhang, L., Chen, M., Wen, Q., Li, Y., Wang, Y., Wang, Y., Qin, Y., Cui, X., Yang, L., Huff, V., et al. (2015). Reprogramming of Sertoli cells to fetal-like Leydig cells by *Wt1* ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 4003–4008.

Zhao, L., Svingen, T., Ng, E.T., and Koopman, P. (2015). Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of *Dmrt1*. *Dev.* *142*, 1083–1088.

Zhao, L., Arsenault, M., Ng, E.T., Longmuss, E., Chau, T.C.Y., Hartwig, S., and Koopman, P. (2017). SOX4 regulates gonad morphogenesis and promotes male germ cell differentiation in mice. *Dev. Biol.* *423*, 46–56.

Zhao, L., Wang, C., Lehman, M.L., He, M., An, J., Svingen, T., Spiller, C.M., Ng, E.T., Nelson, C.C., and Koopman, P. (2018). Transcriptomic analysis of mRNA expression and alternative splicing during mouse sex determination. *Mol. Cell. Endocrinol.* *478*, 84–96.

Zheng, Z., Armfield, B.A., and Cohn, M.J. (2015). Timing of androgen receptor disruption and estrogen exposure underlies a spectrum of congenital penile anomalies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E7194–E7203.

Zhou, Z.X., Lane, M. V., Kemppainen, J.A., French, F.S., and Wilson, E.M. (1995). Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: Receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol. Endocrinol.* 9, 208–218.

Rôle de NR5A1 dans le destin des cellules de Sertoli foetales chez la souris

Résumé

Chez les mammifères le récepteur nucléaire NR5A1 (Steroidogenic Factor 1) est essentiel pour développement du testicule, dans lequel il est notamment exprimé par les cellules somatiques de soutien appelées cellules de Sertoli (CS). La mise en place de l'architecture testiculaire et plus globalement du tractus-urogénital, dépendent de signaux émanant des CS. Mon projet consiste à étudier le rôle de *Nr5a1* dans les CS au cours du développement testiculaire. Pour cela j'ai analysé le phénotype des souris mâles dont le gène *Nr5a1* est invalidé dans les CS après la différenciation sexuelle. Ces travaux ont montré qu'en l'absence de *Nr5a1* les CS ne sont plus en mesure d'assurer leurs fonctions et que leur signature transcriptomique traduit un changement de leur identité. A terme, la totalité des CS invalidées pour *Nr5a1* meurent ce qui nous a permis d'obtenir un modèle d'étude unique pour analyser le développement du testicule et du tractus-urogénital en l'absence de CS. Ensemble mes résultats permettent de mieux appréhender d'une part, le rôle de *Nr5a1* dans le maintien de l'identité des CS et leur survie, et d'autre part de comprendre l'influence des CS sur les autres types cellulaires du testicule et sur le développement du tractus-urogénital.

Mots clés : souris, mutation, testicule, différenciation, NR5A1, Sertoli, Leydig, granulosa, anoïkis, précurseur gonadique, hermaphrodisme, dysgénésie testiculaire.

Summary

In mammals, the NR5A1 nuclear receptor (Steroidogenic Factor 1) is essential for the testis development, in which it is specifically expressed by the somatic supporting cells called Sertoli cells (SC). The establishment of the testicular architecture and more globally of the urogenital tract, depends on signals emanating from the SC. The goal of my project is to study the role of *Nr5a1* gene in SC during testicular development. For this I analyzed the phenotype of male mice in which *Nr5a1* gene is deleted in SC after sexual differentiation. This work shows that in the absence of *Nr5a1*, SC are no longer able to perform their functions effectively and that their transcriptomic signature reflects a change in their identity. Eventually, all of the SC invalidated for *Nr5a1* die, which allowed us to obtain a unique model to analyze the development of the testis and the urogenital tract in the absence of SC. Taken together, these results allowed us to decipher the role of *Nr5a1* in maintaining the identity and the survival of SC, as well as to understand the influence of SC on other cell types of the testis and on the development of the urogenital tract.

Keywords: mice, mutation, testis, differentiation, NR5A1, Sertoli cells, Leydig cells, granulosa cells, anoikis, gonadal precursor, hemaphrodism, testicular dysgenesis.