



**HAL**  
open science

# Détermination du Sexe, Différenciation de la Lignée Germinale, Epigénétique et Fertilité

Maëlle Pannetier

► **To cite this version:**

Maëlle Pannetier. Détermination du Sexe, Différenciation de la Lignée Germinale, Epigénétique et Fertilité. Sciences du Vivant [q-bio]. Paris Saclay University, 2022. tel-04295545

**HAL Id: tel-04295545**

**<https://hal.science/tel-04295545>**

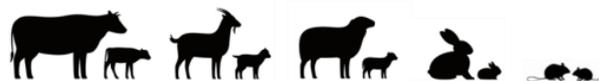
Submitted on 20 Nov 2023

**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.

Copyright

Détermination du Sexe  
Différenciation de la Lignée Germinale  
Épigénétique et Fertilité



Habilitation à diriger des recherches  
de l'Université Paris-Saclay

Présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 24 juin 2022, par

**Maëlle PANNETIER**

UMR1198 INRAE, ENVA, Université Paris-Saclay, BREED  
Biologie de la Reproduction, Environnement, Épigénétique et Développement

**Composition du jury**

**Virginie ROUILLER-FABRE**

Professeure des universités, HDR

Rapporteuse

**Marie-Christine CHABOISSIER**

Directrice de Recherche CNRS, HDR

Rapporteuse

**Francis POULAT**

Chargé de Recherche Hors Classe INSERM, HDR

Rapporteur

**Nathalie BEAUJEAN**

Directrice de Recherche INRAE, HDR

Examinatrice

**Pascal FROMENT**

Directeur de Recherche INRAE, HDR

Examineur

*Je suis ma propre muse...*

Frida Kahlo

Pour Ulysse et Jérôme,

Voici ce qui m'a occupée pendant tant d'années...

# Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier trois chercheur.es qui ont façonné ma vie scientifique.

**Solange Magre, l'initiatrice.** Celle qui m'a donné ma chance, qui a cru en moi et qui m'a donné confiance. C'est avec grande fierté que je peux dire avoir été l'élève de Solange Magre, elle-même élève d'Alfred Jost, le « patron » comme elle disait. Elle m'a donné le goût de la bibliographie, afin d'étancher ma soif de comprendre. Elle m'a donné du temps. Du temps pour discuter, réfléchir, hypothétiser, se tromper et réfléchir encore. Le goût de la recherche, quoi... Merci Solange.

**Geneviève Jolivet, la compagne.** Geneviève qui est toujours à fond et qui donne tout. Tout pour la science, tout pour les étudiants en galère, même quand ce ne sont pas les siens... J'ai beaucoup travaillé avec Geneviève lors de ma thèse alors que nous n'étions ni dans la même équipe, ni dans la même unité... C'est avec grand plaisir et joie que je l'ai retrouvée dans notre équipe après mon recrutement. Elle m'a transmis beaucoup, avec une grande générosité. Elle a toujours été une oreille attentive pour la science, les problèmes de manips, les joies, les peines... et toujours partante pour de bonnes rigolades entre filles ! Merci Geneviève.

**Éric Pailhoux, le « boss ».** Directeur de thèse et mentor. Refaire le monde, et surtout la science ! Nous en avons passé du temps à élaborer, discuter, s'engueuler, rediscuter et rigoler de théories fumeuses parfois, mais aussi de bonnes idées à tester pour avancer, comprendre... Éric m'a fait confiance, m'a ouvert les portes de son équipe, et m'a laissée avancer, m'a laissée gérer. Je crois pouvoir dire que nous avons formé un bon duo scientifique, chacun très différents, mais si complémentaires. Si les discussions scientifiques se font aujourd'hui plus rares, elles n'en restent pas moins riches et enthousiasmantes, comme au premier jour... Merci Éric.

Je souhaiterais ensuite remercier mes étudiantes...

**Mes doctorantes.** Fatemeh, Ma Ma Èva, Clara, Emilie

**Mes licences et masters.** Claire, Stef, Emeline, Léa, Audrey, Julie, Iris

Merci pour votre fraîcheur, votre envie et votre soif de découvrir qui m'ont à chaque fois rappelé pourquoi je faisais ce métier. Vous êtes la sève de nos labos. Mes besoins de transmettre me ramènent aujourd'hui à ma sphère intime, mais Emilie, je ne suis pas loin...

J'aimerais aussi remercier mes techniciennes.

Laurianne, Ikrame et **Marjolaine**.

Cela fait 10 ans que nous travaillons ensemble Marjolaine, 10 ans que nous formons un formidable binôme. Tu gères le quotidien du labo, tu me rappelles à l'ordre quand je m'emballe trop, mais tu finis souvent par te laisser convaincre pour me suivre dans de nouvelles idées. Tu as été mes bras et mes yeux au labo, exigeante et bienveillante envers nos « petites » étudiantes. Je t'ai donné toute ma confiance et tu ne m'as pas déçue. Je te dois beaucoup. Merci Marjo.

Merci aussi à l'ensemble de **l'équipe DGP**

Ainsi qu'aux membres de l'unité **BREED** présents et passés.

Et des remerciements plus particuliers à celles et ceux avec qui j'ai partagé des projets scientifiques pas toujours faciles à mettre en œuvre il faut bien le dire :

**La Team CAROT**

Aurélie D, Namya, Dominique, Luc, Anne AF, **BéA**

**La Team CUT&RUN/Tag**

Amélie, Michelle, Anne G, Mélanie, Eugénie, **BéA**

**La Team GERMIMÂLE**

Hélène K, Eli, Marjo, **BéA**

... et ma collaboratrice et néanmoins amie **Aurélie B**, mon p'tit pimousse.

Merci à Vous de me lire.

Que la science soit avec Vous.

... in goat we trust !

# TABLE DES MATIERES

DEROULEMENT DE CARRIERE .....	5
PREAMBULE .....	5
CURRICULUM VITAE .....	7
TRAVAUX ET PUBLICATIONS .....	14
Liste de Publications .....	15
Liste des Communications .....	18
SYNTHESE DES TRAVAUX DE RECHERCHE .....	25
I. Synthèse des travaux de thèse - 2001-2005 .....	26
A. Contexte scientifique .....	26
B. Principaux Résultats .....	30
1. Conservation de <i>FOXL2</i> chez le poulet .....	30
2. Rôle de <i>FOXL2</i> au cours du développement précoce de l’ovaire de chèvre : Régulation de l’expression de l’ <i>aromatase</i> .....	30
3. Régulation de l’expression de <i>FOXL2</i> .....	31
4. Conservation du rôle de la protéine <i>SRY</i> de chèvre chez la souris .....	31
II. Synthèse des travaux de Post-doctorat - 2005-2007.....	34
A. Contexte scientifique et objectifs.....	34
B. Principaux résultats .....	35
III. Synthèse des travaux réalisés à l’INRA/INRAE depuis 2008 .....	36
A. Recrutement et objectifs.....	36
B. AXE 1 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la détermination du sexe .....	38
1. Étude de l’expression de la protéine <i>SRY</i> au cours du développement testiculaire chez le bouc. Thèse de <i>Fatemeh Montazer-Torbati</i> .....	38
2. Cibles et voies de signalisation régulées par <i>FOXL2</i> au cours de la morphogenèse ovarienne précoce. Thèse de <i>Maëva Elzaïat</i> .....	40
3. Régulation épigénétique de l’expression de <i>FOXL2</i> et voies activées en aval de ce gène dans la gonade. Thèse de <i>Clara Gobé</i> .....	44
3.1. Rôle de <i>DMXL2</i> dans les gonades de souris.....	44
3.2. Régulation de l’expression de <i>Foxl2</i> chez la souris : aspect épigénétique .....	45
4. Rôle de <i>DMRT1</i> dans la détermination du sexe et le maintien de la fertilité chez les mâles : Analyse du phénotype de lapin <i>DMRT1</i> KO. Thèse de <i>Emilie Dujardin</i> .....	48
4.1. <i>DMRT1</i> , détermination du sexe et différenciation des gonades .....	48
4.2. Effets du Knock-out de <i>DMRT1</i> sur la différenciation gonadique .....	51
5. Discussion et Perspectives.....	57
C. AXE 2 Différenciation de la lignée germinale et fertilité .....	64
1. Dynamique de différenciation des cellules germinales dans l’ovaire foetal de lapin – Projet CAROT .....	65
2. Reprogrammation épigénétique des cellules germinales mâles chez les ruminants– Projet GERMIMÂLE ...	68
2.1. Re-méthylation de l’ADN des cellules germinales XY au cours de la vie foetale .....	69
2.2. Méthylation des cellules germinales à la naissance et chez l’adulte : modèle caprin.....	74
3. Discussion – Perspectives.....	78
CONCLUSION .....	81
I. Valorisation des travaux en cours.....	82
II. Programmes ANR débutants.....	84
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	86
ANNEXE 1 – DIFFERENCIATION DE L’OVAIRE.....	96

---

## DEROULEMENT DE CARRIERE

### **PREAMBULE**

---

---

Mon histoire avec le monde de la recherche commence par une rupture. Celle d'une jeune étudiante avec le monde universitaire, qui au milieu de sa Maitrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, s'interroge sur son devenir et décide d'aller faire un tour ailleurs...

Pour voir...

C'est ainsi que poursuivant mes études de Maitrise à mi-temps, j'ai travaillé, à plein temps, comme aide-éducatrice dans une école maternelle de la banlieue nord de Paris. La richesse incroyable que m'a apportée cette aventure ne sera pas détaillée, mais ce fut une expérience formidable.

Formidable, certes, mais qui m'a aussi convaincue de retourner sur les bancs de la fac pour compléter et poursuivre ma Maitrise...

J'avais pu réaliser quelques mini stages découvertes dans des laboratoires de recherche, à la station maritime de Villefranche sur mer (développement de l'oursin) ou à l'ENS Montrouge (caractérisation du promoteur de l'*Amh* de rat) ; mais pour augmenter mes chances de décrocher un DEA, malgré une Maitrise en 2 ans, j'ai réalisé, lors de ma deuxième année, un stage de 9 mois dans le laboratoire d'embryologie de l'hôpital Saint-Antoine de Paris. Dans l'équipe du Pr. Charles Roux, j'ai commencé à m'intéresser aux anomalies de la différenciation sexuelle en travaillant sur un modèle animal du syndrome SLO causé par une mutation de la dernière enzyme de la voie de synthèse du cholestérol (Smith Lemli Optiz).

Et puis, est arrivé ce jour, où inscrite à l'option « Physiologie de la Reproduction », j'assiste pour la première fois à un cours donné par Solange Magre. Je découvre l'histoire rocambolesque de SRY, Alfred Jost et ses folles expériences, WNT4 et l'espoir d'avoir enfin trouvé un déterminant ovarien...

Comment dire... Je tombe en amour...

Voilà... C'est ça que je veux faire.

Je demande un rendez-vous à Solange. Ma motivation la persuade de prendre encore une étudiante supplémentaire (« ...mais vous me prenez par les sentiments... »).

Je suis ensuite acceptée au DEA de Physiologie de la Reproduction de Paris VII et passe 10 mois de stage dans le groupe de Solange. Je fais des cultures de gonades fœtales de rat en sandwich comme Blanche Capel, masculinise des ovaires avec du sérum de veau fœtal, étudie la matrice extracellulaire et les jonctions cellulaires... Et je rencontre Bernard Vigier.

Bernard travaille alors à l'INRA de Jouy-en-Josas, chez Corinne Cotinot. Ne pouvant rester en thèse chez Solange qui avait déjà deux doctorantes, je vais jusqu'à Jouy-en-Josas (mais bon sang, c'est loin !) et passe un entretien avec Corinne Cotinot et Éric Pailhoux. Je défends mon sujet de thèse à l'école doctorale, décroche une bourse... et l'aventure continue.

C'est un peu plus de 20 ans de cette aventure qui est relatée dans ce manuscrit.

Il peut paraître étonnant que je l'écrive à quelques mois de prendre une disponibilité. Mais il me semble important de retracer cette histoire, parce qu'elle est chouette, mais aussi pour remercier et rendre hommage à tous ceux qui y ont pris part et qui l'ont rendue si chatoyante.

Avant d'aller faire un tour ailleurs...

Pour voir...

---

---

**DEROULEMENT DE CARRIERE**  
**CURRICULUM VITAE**

---



**UMR 1198 – BREED** <https://www6.jouy.inrae.fr/breed>

Biologie de la Reproduction, Environnement, Epigénétique et Développement

Equipe Différenciation Gonadique et ses Perturbations

Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex

## PARCOURS PROFESSIONNEL

### Depuis 2008. Chargée de Recherche INRAE

UMR 1198- Biologie de la Reproduction, Environnement, Epigénétique et Développement (création 2020)

Précédemment : UMR1198 - Biologie du Développement et Reproduction (INRA)

Equipe Différenciation des Gonades et ses Perturbations.

*Axes de recherche :*

1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation gonadique

2. Différenciation de la lignée germinales et fertilité

### 2005-2007. Post-doctorante CNRS

CNRS UMR 5535 Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier

Equipe Empreinte Génomique et Développement

CDD CNRS (2ans), contrat ARECA (réseau Epigénétique de l'ARC)

*Sujets de recherche :*

1. Dérégulation de l'empreinte génomique dans le cas d'hépatocarcinomes induits.

2. "Histones Methyl Transferases" impliquées dans la triméthylation de H4K20 au niveau des régions ICR.

### 2001-2005. Doctorante

UMR1198 - Biologie du Développement et Reproduction, INRA, Jouy-en-Josas

Equipe Déterminisme du Sexe et Différenciation des Gonades

Allocation MNERT (3 ans), CDD INRA (3mois), Fondation pour la Recherche Médicale, FRM (9 mois)

*Sujet de recherche : Conservation, rôle et régulation de FOXL2 un facteur clef de la différenciation ovarienne impliqué dans le syndrome PIS (Polled Intersex Syndrome) chez la chèvre*

## PARCOURS ACADEMIQUE

### 2001-2005. Doctorat en science, spécialité Biologie Moléculaire

ED, Des Génomes aux Organismes, Université Versailles/St-Quentin

**Soutenance le 30 Septembre 2005 à l'INRA de Jouy-en-Josas (Mention Très Honorable)**

Directeur de Thèse : Dr. Éric Pailhoux

Président : Pr. Bernard Mignotte

Rapporteur : Dr. Solange Magre

Rapporteur : Dr Marie-Christine Chaboissier

Examineur : Pr. René Habert

Examineur : Dr. Antoine Martinez

Examineur : Dr. Daniel Vaiman

**2000-2001. DEA de Physiologie de la reproduction** (Mention Bien) - Université Pierre & Marie Curie (Paris VI)

**1998-2000. Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie** - Université Pierre & Marie Curie (Paris VI)

Option Biologie du Développement - Mention Bien

Option Physiologie de la Reproduction - Mention Bien

**1997-1998. Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie** - Université Pierre & Marie Curie (Paris VI)

Option Physiologie du Cerveau - Mention Bien

## ACTIVITES DE RECHERCHE ET EXPERTISE

### Production scientifique

---

#### Indice h : 23

Liste complète des publications et communications page 13

28 articles scientifiques originaux dont 7 en premier auteur et 3 en derniers auteur

2 publications de protocoles pour le Cold Spring Harbor Laboratory

6 revues de synthèse en anglais dont 4 en premier auteur

3 revues de synthèse en français dont 2 en premier auteur

1 chapitre d'ouvrage en français

40 communications orales dont 18 en congrès nationaux et 22 en congrès internationaux

45 communications affichées dont 18 en congrès nationaux et 27 en congrès internationaux

### Projets et collaborations de recherche

---

#### Coordination de projets

- 2017-2022. GERMIMÂLE- Reprogrammation épigénétique des cellules germinales mâles (118K€)

Programme APIS-GENE

- 2020. EpiNext – Epigenetics Next-generation (20 K€) – collaboration équipe EPEE BREED (A. Bonnet-Garnier). Crédit Incitatif département PHASE, INRAE

- 2019. CAROT - Cell Atlas of Rabbit Ovarian Transcripts (20K€)

Crédit Incitatif département PHASE, INRA

- 2016. EDITO - Editing de l'épigénome Ovarien (20K€)

Crédit Incitatif département PHASE, INRA

#### Responsable de tâches / participation

- 2022-2026. ANR MEMORI

- 2021-2025. ANR ARDIGERM

- 2020-2024. ANR-RNA-SEX

- 2017-2021. ANR-PRCE-Bosexdim

- 2016-2020. ANR-16-CE14-0020-SexMaintain

- 2012-2014. ANR-CESA-MECABPA

- 2010-2014. ANR-09-GENM-009-GENIDOV

- 2009-2013. ANR-Blanc-PRIFAGENE

2018 - Participation à la rédaction d'un projet européen Horizon 2020 : H2020-SFS-2018-2 – NORMAgene

Responsable de tâche. Non retenu au 2<sup>ème</sup> tour.

#### Collaborations nationales

- UMR1198 BREED, INRAE : Olivier Sandra (2 publications, 4 communications orales, 7 posters), Luc Jouneau (3 publications, 5 communications orales, 2 posters), Hélène Jammes (1 publication, 2 revues de synthèse, 3 communications orales, 5 posters), Hélène Kiefer (2 revues de synthèse, 1 communication orale, 5 posters), Amélie Bonnet-Garnier (2 communications orales), Véronique Duranthon (1 poster), Anne Tarrade (ANR MEMORI)

- UMR1313 GABI, INRAE Jouy-en-Josas : Jean-Luc Vilotte (4 publications, 1 communication orale, 3 posters), Eve Devinoy (1 publication, 1 revue de synthèse, 2 communications orales, 3 posters), Pierre Calvel (1 poster)

- UR1197 NBO, INRAE Jouy-en-josas : Nicolas Meunier (1 publication, 1 poster), Patrice Congar (1 publication, 1 poster)

- UR83 RA, INRAE Nouzilly: Vincent Coustham (1 publication)

- U BOA, INRAE Nouzilly: Marina Govoroun (1 publication, 2 communications orales)

- UR1037 LPGP, INRAE Rennes: Yann Guiguen (3 publications, 1 revue de synthèse, 4 communications orales, 2 posters), Amaury Herpin (2 publications, 3 communications orales, 2 posters)

- Sigenae UR875 BIA, INRAE Toulouse: Christophe Klopp (4 publications, 4 communications orales, 4 posters)
- Sigenae GenPhySE, INRAE Toulouse: Cédric Cabau (1 publication, 1 communication orale, 1 poster), Gwenola Tosser-Klopp
- CNRGV, Toulouse : Hélène Berges / Genséric Beydon
- ALLICE : Aurélien Capitan (2 publications), Aurélie Allais-Bonnet (6 publications, 4 communications orales, 8 posters), Eli Sellem (1 publication, 2 revues de synthèse, 1 communication orale, 3 posters)
- UMR-INSERM U1091-CNRS 7277, Nice : Anne-Amandine Chassot (2 publications, 1 revue de synthèse, 1 communication orale, 3 posters), Marie-Christine Chaboissier (2 publications, 1 revue de synthèse, 1 communication orale, 3 posters)
- INSERM UMR 967/CEA, DSV-iRCM-LDG, Fontenay aux roses : Gabriel Livera (1 poster)
- CNRS UMR 7592/Université Paris 7, Institut Jacques Monod, Paris : Reiner Veitia (4 publications, 1 revue de synthèse, 1 communication orale)

### Collaborations internationales

- Universidad del Rosario, Bogota, COLOMBIA : Paul Laissue
- Monash University, Clayton, AUSTRALIA : Dagmar Wilhelm (1 publication)
- NIEHS, Durham, USA : Humphrey Yao (1 publication)

### Participation à des réseaux

- Réseau GDR Repro (réseau national)
- Réseau Différenciation des Gonades chez le Vertébrés (réseau national).
- Réseau EpiPHASE - Epigénétique en PHASE (réseau INRA)

### Expertise scientifique

---

Depuis 2020 :

- Membre élu du Conseil Scientifique du Département de Physiologie Animale de INRAE
- Membre du bureau de la Commission Scientifique Spécialisée 'BioA' de INRAE (CSS BioA)

2021. Membre du jury pour le concours CRCN INRAE n°24

2015. Evaluation projet ANR DEFI 4 "Vie, Santé et Bien-être".  
Commission "Toxicologie / Ecotoxicologie" : Expert extérieur.

2013. Evaluation projet "Chercheur d'avenir " - Région Languedoc-Roussillon : Expert extérieur.

Depuis 2011: relecture d'articles. Plos One (4), BMC genomics (3), Reproduction (2), Epigenomics (1), Frontiers in genetics (1), Genes (1), Biology of Reproduction (1), Sexual Development (1), Reproduction in Domestic Mammals (1), Reproductive Biology (1), Animal Reproduction (1), Journal of Ovarian Research (1), Asian Journal of Andrology (1), Animal Genetics (1), Theriogenology (1), Electronic Journal of Biotechnology (1), Clinical Genetics (1).

### Actions d'animation de la communauté scientifique

---

2013-2017. Responsable de l'animation scientifique de l'unité Biologie du Développement et de la Reproduction. Organisation des séminaires hebdomadaires.

2013. Organisation du Colloque Différenciation des Gonades chez les Vertébrés (19 Mars 2013) sur le centre INRA de Jouy-en-Josas, France.

2005. Organisation du 1<sup>er</sup> colloque des jeunes chercheurs de l'INRA de Jouy (colloque Doc'J)

2004-2005. Membre du conseil d'administration de Doc'J, l'association des doctorants de l'INRA de Jouy

## ACTIVITE D'ENCADREMENT DE JEUNES CHERCHEURS

### Co-encadrements de thèse et co-publications

---

Co-encadrement avec Dr. Éric Pailhoux, DR INRAE

Liste des Publications : pages 12 à 23

- **Emilie Dujardin** (depuis le 1<sup>er</sup> Octobre 2020)  
**Rôle de *DMRT1* dans la détermination du sexe et le maintien de la fertilité chez les mâles : Analyse du phénotype de lapin *DMRT1 KO***  
Université Paris Saclay – ED BioSigne  
Financement ANR (RNAsex) / INRAE (département PHASE)  
3 Communications orales associées : n°6.1, 6.2, 6.5  
5 Communications affichées associées : n°7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5
- **Clara Gobé** (1<sup>er</sup> Octobre 2014 - 3 décembre 2018)  
**Régulation épigénétique de l'expression de *FOXL2* et voies activées en aval de ce gène dans la gonade**  
Université Paris Saclay – ED BioSigne  
Financement MRT (3ans).  
2 Publications associées : n°1.4, 1.5  
4 Communications orales associées : n°6.8, 6.10, 6.11, 6.13  
4 Communications affichées associées : n°7.11, 7.17, 7.18, 7.21
- **Maëva Elzaiat** (1<sup>er</sup> Octobre 2011 - 16 octobre 2015)  
**Cibles et voies de signalisation régulées par *FOXL2* au cours de la morphogenèse ovarienne précoce**  
Université Paris Saclay – ED BioSigne  
Financement MRT (3ans), puis FRM (8 mois)  
5 Publications associées : n°1.5, 1.8, 1.9, 1.11 et n°3.3  
5 Communications orales associées : n°6.16, 6.17, 6.19, 6.21, 6.26  
7 Communications affichées associées : n°7.17, 7.18, 7.21, 7.22, 7.23, 7.25, 7.26
- **Fatemeh Montazer-Torbati** (1<sup>er</sup> mars 2007 - 7 décembre 2010)  
**Étude de l'expression de la protéine *SRY* au cours du développement testiculaire chez le bouc**  
Co-encadrement à partir de Juillet 2008.  
Université de Versailles Saint Quentin – ED des génomes aux organismes  
Financement IRAN/INRA  
3 Publications associées : n° 1.8, 1.16, 1.17  
3 Communications orales associées : n° 6.29, 6.32, 6.34  
5 Communications affichées associées : n° 7.29, 7.32, 7.33, 7.34, 7.35

### Encadrement de Masters et Licences

---

#### MASTER 2

- **Iris Barka**. Septembre 2021 à Juin 2022. M2 ReproDev. Université Paris VII  
Spermatogenèse et fertilité chez le lapin : rôle de *DMRT1* et de l'acide rétinoïque
- **Audrey Albina**. Septembre 2019 à Juin 2020. M2 ReproDev. Université Paris VII  
Œstrogènes et fertilité chez les mâles : Spermatogenèse et épigénome des cellules germinales chez les lapins *CYP19 KO*
- **Clara Gobé**. Septembre 2013 à Juin 2014. M2 ReproDev. Université Paris VII  
Analyse du phénotype gonadique de souris invalidées pour *Dmxl2*

- **Emeline Lebourdais.** Septembre 2011 à Juin 2012. M2 ReproDev. Université Paris VII  
Etude de l'expression de gènes du chromosome Y durant le développement gonadique chez le bouc
- **Maëva Elzaïat.** Septembre 2010 à Juin 2011. M2 ReproDev. Université Paris VII  
Identification et caractérisation des cibles de FOXL2 dans l'ovaire précoce de chèvre
- **Stéphanie Roy.** Février à Juin 2009 - Université de Versailles Saint Quentin  
Effets des estrogènes sur la différenciation ovarienne précoce chez la chèvre
- **Claire Marchand.** Février à Juin 2007- Université de Montpellier II  
Etude de la régulation de l'empreinte parentale au niveau des loci *Kcnq1* et *Igf2/H19* dans le cas d'hépatocarcinomes induits, chez la souris.

### MASTER 1

- **Julie Fuminier.** Avril 2021 – Juin 2021. Université François Rabelais  
Analyse de l'expression spatio-temporelle de l'ARN hélicase DHX37 au cours de la détermination du sexe et de la différenciation gonadique chez le lapin
- **Clara Gobé.** Avril 2013 - Juillet 2013. Université François Rabelais  
Analyse du phénotype gonadique de souris invalidées pour *Dmxl2*

### LICENCE 3

- **Léa Chicoïse.** Avril 2015 - Juin 2015. Université Orsay/Paris Sud  
Analyse du phénotype ovarien de souris invalidées pour *Adamts19*

## Activités d'accompagnement de la formation doctorale

---

### Jury de thèse – Examinatrice :

Vincent Pacini, Université Paris Diderot, IMR 8251, Paris : 30 mars 2021

Morgane Le Rolle, Institut Valrose, UMR-INSERM U1091-CNRS 7277, Nice : 29 Novembre 2019

Charlotte François, Université Paris Diderot, IMR 8251, Paris : 12 mai 2016

### Jury de thèse – Co-Directrice de thèse

Clara Gobé : 3 décembre 2018

Maëva Elzaïat : 16 octobre 2015

Fatemeh Montazer-Torbati : 7 décembre 2010

### Comité de Thèse – Tutrice

Audrey Lesage-Padilla, UMR1198 BDR INRA Jouy-en-Josas : 2 juillet 2015 -

## Activités d'enseignement

---

Depuis 2013. Magistère Européen de Génétique (Master 1), Université Paris Diderot (Paris VII) 2002-2004. Travaux dirigés en Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie, Université Versailles St Quentin

---

**DEROULEMENT DE CARRIERE**  
**TRAVAUX ET PUBLICATIONS**

---

## Liste de Publications – Maëlle Pannetier

Publications en 1er auteur

Publications en dernier auteur

Communications réalisées avec **les étudiants co-encadrés**

\*Contribution égale.

### Articles scientifiques originaux

- 1.1 Jolivet G, Daniel-Carlier N, Harscoët E, Airaud E, Dewaele A, Pierson C, Giton F, Boulanger L, Daniel N, Mandon-Pépin B, **Pannetier M**, Pailhoux E (2022). Fetal estrogens are not involved in sex determination but critical for early ovarian differentiation. **Endocrinology**. 2022 Jan 1;163(1):bqab210. DOI: 10.1210/endo/bqab210.
- 1.2 Eozenou C, Lesage-Padilla A, Mauffré V, Healey GD, Camous S, Bolifraud P, Giraud-Delville C, Vaiman D, Shimizu T, Miyamoto A, Sheldon IM, Constant F, **Pannetier M**, Sandra O (2020). FOXL2 is a Progesterone Target Gene in the Endometrium of Ruminants. **Int J Mol Sci**. 2020 Feb 21;21(4):1478. DOI: 10.3390/ijms21041478.
- 1.3 Nicol B, Grimm SA, Chalmel F, Lecluze E, **Pannetier M**, Pailhoux E, Dupin-De-Beyssat E, Guiguen Y, Capel B, Yao HH (2019). RUNX1 maintains the identity of the fetal ovary through an interplay with FOXL2. **Nat Commun**. 2019 Nov 11;10(1):5116. DOI: 10.1038/s41467-019-13060-1.
- 1.4 Herpin A, Schmidt C, Kneitz S, **Gobé C**, Regensburger M, Le Cam A, Montfort J, Adolphi MC, Lillesaar C, Wilhelm D, Kraeussling M, Mourot B, Porcon B, **Pannetier M**, Pailhoux E, Ettwiller L, Dolle D, Guiguen Y, Schartl M (2019). A novel evolutionary conserved mechanism of RNA stability regulates synexpression of primordial germ cell-specific genes prior to the sex-determination stage in medaka. **PLoS Biol**. 2019 Apr 4;17(4):e3000185. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000185.
- 1.5 **Gobé C**, **El Zaiat M**, Meunier N, André M, Sellem E, Congar P, Jouneau L, Allais-Bonnet A, Naciri I, Passet B, Pailhoux E, **Pannetier M** (2019). Dual role of DMXL2 in olfactory information transmission and the first wave of spermatogenesis. **PLoS Genet**. 2019 Feb 8;15(2):e1007909. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007909.
- 1.6 Bertho S, Herpin A, Branthonne A, Jouanno E, Yano A, Nicol B, Muller T, **Pannetier M**, Pailhoux E, Miwa M, Yoshizaki G, Schartl M, Guiguen Y (2018). The unusual rainbow trout sex determination gene hijacked the canonical vertebrate gonadal differentiation pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2018 Dec 11;115(50):12781-12786. DOI: 10.1073/pnas.1803826115.
- 1.7 David SA, Piégu B, Hennequet-Antier C, **Pannetier M**, Aguirre-Lavin T, Crochet S, Bordeau T, Couroussé N, Brionne A, Bigot Y, Collin A, Coustham V (2017). An assessment of fixed and native chromatin preparation methods to study histone post-translational modifications at a whole genome scale in skeletal muscle tissue. **Biol Proced Online**. 2017 Aug 29;19:10. DOI: 10.1186/s12575-017-0059-0.
- 1.8 Allais-Bonnet A, Castille J, **Pannetier M**, Passet B, **El Zaiat M**, André M, **Montazer-Torbati F**, Moazami-Goudarzi K, Vilotte JL, Pailhoux E (2016). A specific role for PRND in goat foetal Leydig cells is suggested by prion family gene expression during gonad development in goats and mice. **FEBS Open Bio**. 2016 Jan 14;6(1):4-15. DOI: 10.1002/2211-5463.12002.
- 1.9 **El Zaiat M**, Jouneau L, Thépot D, Klopp C, Allais-Bonnet A, Cabau C, André M, Chaffaux S, Cribiu EP, Pailhoux E, **Pannetier M** (2014). High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats. **Biol Reprod**. 2014 Dec;91(6):153. DOI: 10.1095/biolreprod.114.122796.

1.10 Nguyen M, Boutinaud M, Pétridou B, Gabory A, **Pannetier M**, Chat S, Bouet S, Jouneau L, Jaffrezic F, Laloë D, Klopp C, Brun N, Kress C, Jammes H, Charlier M, Devinoy E (2014). DNA Methylation and Transcription in a Distal Region Upstream from the Bovine AlphaS1 Casein Gene after Once or Twice Daily Milking. **PLoS One**. 2014; 9(11):e1111556. DOI: 10.1371/journal.pone.01111556.

1.11 Boulanger L\*, **Pannetier M\***, Gall L, Allais-Bonnet A, **El Zaiat M**, LeBourhis D, Daniel N, Richard C, Cotinot C, Ghyselinck NB, Pailhoux E (2014). FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. **Curr Biol**. 2014 ; 24(4):404-8. DOI: 10.1016/j.cub.2013.12.039.

1.12 Allais-Bonnet A, Grohs C, Medugorac I, Krebs S, Djari A, Graf A, Fritz S, Seichter D, Baur A, Russ I, Bouet S, Rothammer S, Wahlberg P, Esquerré D, Hoze C, Boussaha M, Weiss B, Thépot D, Fouilloux MN, Rossignol MN, van Marle-Köster E, Hreiðarsdóttir GE, Barbey S, Dozias D, Cobo E, Reversé P, Catros O, Marchand JL, Soulas P, Roy P, Marquant-Leguienne B, Le Bourhis D, Clément L, Salas-Cortes L, Venot E, **Pannetier M**, Phocas F, Klopp C, Rocha D, Fouchet M, Journaux L, Bernard-Capel C, Ponsart C, Eggen A, Blum H, Gallard Y, Boichard D, Pailhoux E, Capitan A (2013). Novel insights into the bovine polled phenotype and horn ontogenesis in Bovidae. **PLoS One**. 2013;8(5) DOI: 10.1371/journal.pone.0063512.

1.13 Capitan A, Allais-Bonnet A, Pinton A, Marquant-Le Guienne B, Le Bourhis D, Grohs C, Bouet S, Clément L, Salas-Cortes L, Venot E, Chaffaux S, Weiss B, Delpuch A, Noé G, Rossignol MN, Barbey S, Dozias D, Cobo E, Barasc H, Auguste A, **Pannetier M**, Deloche MC, Lhuillier E, Bouchez O, Esquerré D, Salin G, Klopp C, Donnadiou C, Chantry-Darmon C, Hayes H, Gallard Y, Ponsart C, Boichard D, Pailhoux E (2012). A 3.7 Mb deletion encompassing ZEB2 causes a novel polled and multisystemic syndrome in the progeny of a somatic mosaic bull. **PLoS One**. 2012;7(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0049084.

1.14 Eozenou C, Vitorino Carvalho A, Forde N, Giraud-Delville C, Gall L, Lonergan P, Auguste A, Charpigny G, Richard C, **Pannetier M**, Sandra O (2012). FOXL2 Is Regulated During the Bovine Estrous Cycle and Its Expression in the Endometrium Is Independent of Conceptus-Derived Interferon Tau. **Biol Reprod**. 2012 Aug 9;87(2):32. DOI: 10.1095/biolreprod.112.101584.

1.15 Auguste A, Chassot AA, Grégoire EP, Renault L, **Pannetier M**, Treier M, Pailhoux E, Chaboissier MC (2011). Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. **Sex Dev**. 2011;5(6):304-17. DOI: 10.1159/000334517.

1.16 **Montazer-Torbati F**, Kocer A, Auguste A, Renault L, Charpigny G, Pailhoux E, **Pannetier M** (2010). A study of goat SRY protein expression suggests putative new roles for this gene in the developing testis of a species with long-lasting SRY expression. **Dev Dyn**. 2010 Dec;239(12):3324-35. DOI: 10.1002/dvdy.22452.

1.17 Buscara L, **Montazer-Torbati F**, Chadi S, Auguste A, Laubier J, Chassot AA, Renault L, Passet B, Costa J, **Pannetier M**, Vilotte M, Chaboissier MC, Vilotte JL, Pailhoux E, Le Provost F (2009). Goat RSPO1 over-expression rescues sex-reversal in Rspo1-knockout XX mice but does not perturb testis differentiation in XY or sex-reversed XX mice. **Transgenic Res**. 2009 Aug;18(4):649-54. DOI: 10.1007/s11248-009-9247-2.

1.18 Boulanger L, Kocer A, Daniel N, **Pannetier M**, Chesne P, Heyman Y, Renault L, Mandon-Pepin B, Chavatte-Palmer P, Vignon X, Vilotte JL, Cotinot C, Renard JP, Pailhoux E (2008). Attempt to rescue sex-reversal by transgenic expression of the PISRT1 gene in XX PIS-/- goats. **Sex Dev**. 2008;2(3):142-51. DOI: 10.1159/000143432.

1.19 **Pannetier M**, Julien E, Schotta G, Tardat M, Sardet C, Jenuwein T, R. Feil (2008). Pr-Set7 and Suv4-20h1/h2 regulate H4 lysine-20 methylation at Imprinting Control Regions. **EMBO Rep**. 2008 Oct;9(10):998-1005. DOI: 10.1038/embor.2008.147.

1.20 Kocer A, Pinheiro I, **Pannetier M**, Renault L, Parma P, Radi O, Kim K-A, Camerino G, Pailhoux E (2008). R-spondin1 and FOXL2 act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation. **BMC Dev Biol**. 2008 Apr 2;8:36. DOI: 10.1186/1471-213X-8-36.

- 1.21 **Pannetier M**, Tilly G, Kocer A, Hudrisier M, Renault L, Chesnais N, Costa J, Leprovost F, Vaiman D, Vilotte JL, Pailhoux E (2006). Goat SRY induces testis development in XX transgenic mice. **FEBS Lett.** 2006 Jun 26;580(15):3715-20. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.05.060.
- 1.22 **Pannetier M**, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E (2006). FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription in vitro: toward a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. **J Mol Endocrinol.** 2006 Jun;36(3):399-413. DOI: 10.1677/jme.1.01947.
- 1.23 **Pannetier M**, Renault L, Jolivet G, Cotinot C, Pailhoux E (2005). Ovarian-specific expression of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by FOXL2 bi-directional promoter. **Genomics.** 2005 Jun;85(6):715-26. DOI: 10.1016/j.ygeno.2005.02.011.
- 1.24 Cocquet J, **Pannetier M**, Fellous M, Veitia RA (2005). Sense and antisense Foxl2 transcripts in mouse. **Genomics.** 2005 May;85(5):531-41. DOI: 10.1016/j.ygeno.2005.01.007.
- 1.25 Govoroun M\*, **Pannetier M\***, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I, Batellier F, Cotinot C (2004). Isolation of chicken homolog of FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. **Dev Dyn.** 2004 Dec;231(4):859-70. DOI: 10.1002/dvdy.20189.
- 1.26 Cocquet J, De Baere E, Gareil M, **Pannetier M**, Xia X, Fellous M, Veitia RA (2003). Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. **Cytogenet Genome Res.** 2003;101(3-4):206-11. DOI: 10.1159/000074338.
- 1.27 **Pannetier M**, Serval N, Cocquet J, Besnard N, Cotinot C, Pailhoux E (2003). Expression studies of the PIS-regulated genes suggest different mechanisms of sex determination within mammals. **Cytogenet Genome Res.** 2003;101(3-4):199-205. DOI: 10.1159/000074337.
- 1.28 Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, Serval N, Xia X, **Pannetier M**, De Baere E, Messiaen L, Cotinot C, Fellous M, Veitia RA (2002). Evolution and expression of FOXL2. **J Med Genet.** 2002 Dec;39(12):916-21. DOI: 10.1136/jmg.39.12.916.

## Publication de protocoles

---

- 2.1 Wagschal A, Delaval K, **Pannetier M**, Arnaud P, Feil R (2007). [PCR-Based Analysis of Immunoprecipitated Chromatin](#). CSH Protoc. 2007 Jun 1;2007:pdb.prot4768. DOI: 10.1101/pdb.prot4768.
- 2.2 Wagschal A, Delaval K, **Pannetier M**, Arnaud P, Feil R (2007). [Chromatin Immunoprecipitation \(ChIP\) on Unfixed Chromatin from Cells and Tissues to Analyze Histone Modifications](#). CSH Protoc. 2007 Jun 1;2007:pdb.prot4767. DOI: 10.1101/pdb.prot4767.

## Revue de synthèse en anglais

---

- 3.1 Kiefer H, Sellem E, Bonnet-Garnier A, **Pannetier M**, Costes V, Schibler L, Jammes H (2021). The epigenome of male germ cells and the programming of phenotypes in cattle. **Animal Frontiers.** 2021 ; Anim Front. 2021 Dec 17;11(6):28-38. DOI: 10.1093/af/vfab062.
- 3.2 **Pannetier M**, Chassot AA, Chaboissier MC, Pailhoux E (2016). Involvement of FOXL2 and RSP01 in Ovarian Determination, Development, and Maintenance in Mammals. **Sex Dev.** 2016;10(4):167-184. DOI: 10.1159/000448667.
- 3.3 **Pannetier M**, **El Zaiat M**, Thépot D, Pailhoux E (2012). Telling the story of XX sex reversal in the goat: highlighting the sex-crossroad in domestic mammals. **Sex Dev.** 2012;6(1-3):33-45. DOI: 10.1159/000334056
- 3.4 **Pannetier M**, Feil R (2007). Epigenetic stability of embryonic stem cells and developmental potential.

**Trends Biotechnol.** 2007 Dec;25(12):556-62. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.09.003.

- 3.5 Baron D, Batista F, Chaffaux S, Cocquet J, Cotinot C, Cribiu E, De Baere E, Guiguen Y, Jaubert F, Pailhoux E, **Pannetier M**, Vaiman D, Vigier B, Veitia R, Fellous M (2005). Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. **Reprod Nutr Dev.** 2005 May-Jun;45(3):377-82. DOI: 10.1051/rnd:2005028.
- 3.6 **Pannetier M**, Mandon-Pépin B, Copelli S, Fellous M (2004). Molecular aspects of female and male gonadal development in mammals. **Pediatr Endocrinol Rev.** 2004 Mar;1(3):274-87 PMID: 16437021

## Revue de Synthèse en français

---

- 4.1 Beaujean N, Boutinaud M, Devinoy E, Jammes H, Le Guillou S, Le Provost F, Leroux C, Mobuchon L, **Pannetier M**, Sellem E, Kiefer H (2020). L'épigénétique et la construction du phénotype chez le bovin. **INRA Productions Animales**, 33(2), Septembre 2020. DOI: 10.20870/productions-animales.2020.33.2.4477
- 4.2 **Pannetier M**, Pailhoux E (2011). La Différenciation du Sexe : Acquis et Perspectives. [Sex differentiation: state of the art and future prospects]. **Med Sci (Paris)**. 2011 Oct;27(10):859-65. DOI: 10.1051/medsci/20112710014.
- 4.3 **Pannetier M**, Pailhoux E. (2010). FOXL2, le gardien de l'identité ovarienne. [FOXL2, the gatekeeper of ovarian identity]. **Med Sci (Paris)**. 2010 May;26(5):470-3. DOI: 10.1051/medsci/2010265470.

## Chapitres d'ouvrages

---

- 5.1. Pailhoux E, **Pannetier M**, Mandon-Pépin B (2014). La différenciation sexuelle des gonades et de l'appareil génital. **La reproduction animale et humaine**, Editions Quae, 751 p., 2014, Synthèses (Quae), 978-2-7592-2208-7

## Liste de Communications – Maëlle Pannetier

### Orateur/Présentateur

Communications réalisées avec **les étudiants co-encadrés**

### Communications Orales

6.1 **Dujardin M**, Mellouk N, André M, Mandon-Pépin B, Dewaele A, Canon E, Jolivet G, Pailhoux E, **Pannetier M**. DMRT1 is a Sex-Determining Gene in Rabbits. 54th SSR Annual Meeting, Dec 2021, Saint-Louis, United States.

6.2 **Dujardin M**, Mellouk N, André M, Mandon-Pépin B, Dewaele A, Canon E, Jolivet G, Pailhoux E, **Pannetier M**. DMRT1 is Required For Sex Determination in Rabbits. First Virtual International Symposium on Vertebrate Sex Determination, Oct 2021, Kona, Hawaii, United States.

6.3 André M, Mandon-Pépin B, Allais-Bonnet A, Jammes H, Bonnet-Garnier A, Gélén V, Sellem E, Pailhoux E, Kiefer H, **Pannetier M**. Différenciation et reprogrammation épigénétique des cellules germinales mâles dans le testicule fœtal bovin. EPIPHASE, Jun 2021, Lyon, France

6.4 Canon E, Mellouk N, Dewaele A, Mandon-Pépin B, Jouneau L, Halstead M, Aubert-Frambourg A, Jolivet G, Bonnet-Garnier A, Pailhoux E, **Pannetier M**. Dynamique de l'épigénome des cellules germinales femelles lors de l'initiation de la méiose dans l'ovaire fœtal de lapin : Analyse des modifications post-traductionnelles des histones par CUT&RUN. EPIPHASE, Jun 2021, Lyon, France.

6.5 Mellouk N, Mandon-Pépin B, Dewaele A, Jouneau L, **Dujardin E**, Aubert-Frambourg A, Jolivet G, Pailhoux E, **Pannetier M**. Caractérisation des trajectoires de différenciation des cellules germinales au cours de la différenciation de l'ovaire fœtal chez le lapin. EPIPHASE, Jun 2021, Lyon, France.

6.6 Halstead M, Laffont L, Aubert-Frambourg A, Jouneau L, Canon E, **Pannetier M**, Bonnet-Garnier A. Contributions maternelles et zygotiques à la reprogrammation des enhancers chez les embryons bovins pré-implantaires. EPIPHASE, Jun 2021, Lyon, France.

6.7 Bertho S, Herpin A, Branthonne A, Jouanno E, Yano A, Nicol B, Muller T, **Pannetier M**, Pailhoux E, Miwa M, Yoshizaki G, Schartl M, Guiguen Y. Sdy, the unusual rainbow trout sex determination gene, hijacked the canonical vertebrate gonadal differentiation pathway. In 4. International Conference on Integrative Salmonid Biology, ICISB 2019, Edimbourg, United Kingdom, November 2019a. BBSRC Roslin Institute, GBR.

6.8 Herpin A, Schmidt C, Kneitz S, **Gobé C**, Regensburger M, Le Cam A, Montfort J, Adolphi MC, Lillesaar C, Kraeussling M, Mourot B, Porcon B, **Pannetier M**, Pailhoux E, Ettwiller L, Dolle D, Guiguen Y, Schartl M. Transcriptional rewiring, post-transcriptional regulation and neo-functionalization: how the master sex-determining gene of medaka was born. In Workshop: Paradigmshift in sex chromosome evolution, Abstracts of the workshop, page np, Berlin, Germany, September 2019. Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (IGB).

6.9 **Pannetier M**. Reprogrammation épigénétique des cellules germinales mâles chez les ruminants. 1<sup>ère</sup> demi-journée d'animation scientifique SAPS du Projet Phare 1 : Elaboration précoce et Plasticité des Phénotypes, April 2018. Jouy-en-Josas, France.

6.10 **Gobé C**, Daniel-Carliet N, Jolivet G, André M, Pailhoux E, **Pannetier M**. In vitro studies of the long-range regulation of FOXL2 expression by epigenome editing. 3<sup>ème</sup> Journée de Séminaires du Département Phase sur l'Épigénétique. May 2017. Jouy-en-Josas, France.

- 6.11 **Gobé C**, Daniel-Carlier N, André M, Thépot D, Jolivet G, Pailhoux E, **Pannetier M**. *In vitro* studies of the distal regulation of FOXL2 expression by epigenome editing. 2<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du GdR Repro. Avril **2017**. France.
- 6.12 **Bertho S**, Herpin A, Dupin de Beyssat E, Yano A, Muller T, Nicol B, **Pannetier M**, Pailhoux E, Scharl M, Guiguen Y. "SdY", the bizarremaster sex determinant of salmonids, triggers its action by directly hijacking the conserved gonadal differentiation pathway. 1st European Symposium on Sex Determination in Vertebrates. Mar **2017**. Dinard, France.
- 6.13 **Gobé C**, Daniel-Carlier N, André M, Thepot D, Jolivet G, Pailhoux E, **Pannetier M**. Long range regulation of FOXL2 expression by epigenome editing. 1st European Symposium on Sex Determination in Vertebrates. Mar **2017**. Dinard, France.
- 6.14 **Pannetier M**, Boulanger L, Jouneau L, Thépot D, **Pailhoux E**. Genetic cascade of sex determination in goats. 7th International Symposium on the Biology Vertebrate Sex Determination, Seventh International Symposium on the Biology Vertebrate Sex Determination. April **2015**. Kona, Hawaii, United States.
- 6.15 **Pannetier M**. FOXL2 invalidation in goat. 6th Annual meeting of the EFOR Network. Mar **2015**. Paris, France.
- 6.16 **Boulanger L**, **Pannetier M**, Gall L, Allais Bonnet A, **El Zaiat M**, Le Bourhis D, Daniel N, Richard C, Cotinot C, Ghyselinck NB, Pailhoux E. FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. Opening Conference "COST Action BM1308. Sharing Advances on Large Animal Models". Décembre **2014**. Munich, Germany.
- 6.17 **Pannetier M**, **El Zaiat M**, Boulanger L, Allais-Bonnet A, Gall L, **Pailhoux E**. FOXL2, a critical regulator of steroid synthesis, acts as a female sex-determining gene in goats. Conference of European Comparative Endocrinologists. Aout **2014**. Rennes, France.
- 6.18 Nguyen M, Boutinaud M, Petridou B, Chat S, Bouet S, Laloë D, Jaffrézic F, Gabory A, Kress C, Galio L, Charlier M, **Pannetier M**, Klopp C, Jammes H, **Devinoy E**. La monotraite induit la méthylation d'une région régulatrice distale en amont du gène de la caséine-S1. 20<sup>èmes</sup> Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. Décembre **2013**. France.
- 6.19 Boulanger L, **Pannetier M**, Gall L, Allais-Bonnet A, **El Zaiat M**, Le Bourhis D, Daniel N, Richard C, Cotinot C, **Pailhoux E**. Invalidation du gène FOXL2 chez la chèvre ; démonstration de son rôle de déterminant ovarien chez les bovidés. 5<sup>èmes</sup> Journées d'Animation Scientifique du département Phase (JAS Phase 2013). Octobre **2013**. Paris, France.
- 6.20 **Eozenou C**, Mauffré V, Reinaud P, Camous S, Bolifraud P, Albert JP, Shimizu T, Miyamoto A, **Pannetier M**, Constant F, Al-Gubory KH, Sandra O. FOXL2 is inhibited by progesterone in ruminant endometrium. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR). Juillet **2013**. Montréal, Québec, Canada.
- 6.21 **El Zaiat M**, **Pannetier M**. FOXL2 chez la chèvre : à la recherche du facteur Z. Colloque Différenciation des Gonades chez les Vertébrés. 19 Mars **2013**. Jouy-en-Josas, France.
- 6.22 **Carvalho A**, Jolivet G, Kara-Ali K, Eozenou C, Giraud-Delville C, Gall L, Krauss D, Richard C, **Pannetier M**, Klopp C, Hue I, Sandra O. CHIPSTRAFFIC : identification des gènes cibles de facteurs de transcription bovins par ChIP et ChIP-seq dans l'endomètre et les tissus extra-embryonnaires à l'implantation. Séminaire de restitution AIP Bioressource. Février **2013**. Paris, France.
- 6.23 Nguyen M, Bouet S, Boutinaud M, Petridou B, Dessauge F, Charlier M, Gabory A, Galio L, Jammes H, Klopp C, Kress C, Sandra O, **Pannetier M**, **Devinoy E**. DNA methylation and ncRNA transcription at aCSN1S1 regulatory region in the bovine mammary gland. 9<sup>th</sup> International Symposium on Milk Genomics and Human Health. Octobre, **2012**. Wageningen, the Netherlands.
- 6.24 **Eozenou C**, Vitorino-Carvalho A, Forde N, **Pannetier M**, Richard C, Shimizu T, Bauersachs S, Giraud-Delville C, Myamoto A, Charpigny G, Lonergan P, Pailhoux E, Sandra O. FOXL2 endometrial expression is

impacted by P4 and not IFNT in cattle. Society of Reproduction and Fertility conference. July 9-11, **2012**. Edinburgh, UK.

6.25 **Pannetier M**, Kocer A, Naciri I, Chaffaux S, Cribiu EP, Thépot D, Pailhoux E. Long non-coding RNAs and sex determining gene regulation in ruminants. Sixth International symposium on the biology of vertebrate sex determination. April 23-27, **2012**. Kona, Hawaii, USA.

6.26 **El Zaiat M**, Thépot D, Jouneau L, Bonnet A, Klopp C, Cabau C, Pailhoux E, **Pannetier M**. Involvement of DMRT1 in XX sex-reversed polled goats. Sixth International symposium on the biology of vertebrate sex determination. April 23-27, **2012**. Kona, Hawaii, USA.

6.27 **Pannetier M**. Étude de la protéine SRY au cours du développement testiculaire de bouc. Colloque Différenciation des Gonades chez les Vertébrés. 24 Novembre 2010, Paris.

6.28 **Eozenou C**, Carvalho A, Gall L, Forde N, Giraud-Delville C, **Pannetier M**, Auguste A, Tarrade A, Charpigny G, Roche JF, Richard C, Sandra O. Characterisation of the Forkhead box transcription factor FOXL2 in the bovine endometrium during early pregnancy. Third General Meeting of GEMINI. October 1-3, **2010**. Soustons, France.

6.29 **Montazer-Torbati F**, **Pannetier M**, Kocer A, Auguste A, Renault L & Pailhoux E. SRY protein expression during testis development in goat. 16<sup>th</sup> European Workshop Testis. May 8-12, **2010**. Island of Elba, Italy.

6.30 **Auguste A**, Chassot AA, Grégoire E, **Pannetier M**, Treier M, Pailhoux E, Chaboissier MC. Invalidation de Foxl2 et R-spondin1 chez la souris : étude de deux voies de différenciation ovarienne. 3<sup>èmes</sup> Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage. Octobre 2009, Tours, France.

6.31 **Pannetier M**, Kocer A, Boulanger L, Renault L, **Pailhoux E**. Goats, an alternative sex-determination model within mammals. Fifth International Symposium on Vertebrate Sex Determination. April 20-24, **2009**. Kona, Hawaiï, USA.

6.32 **Montazer-Torbati F**, **Pannetier M**, Kocer A, Auguste A, Renault L, Pailhoux E. SRY protein expression during testis development in goat. Fifth International Symposium on Vertebrate Sex Determination. April 20-24, **2009**. Kona, Hawaii, USA.

6.33 Kocer A, **Pannetier M**, Renault L, **Pailhoux E**. Sex Differentiation in Mammals: What about Polled Goats? *Sex. Dev* 2, 285-285. XXth International Congress of Zoology, August 26-29, **2008**. Paris, France.

6.34 Chadi S, Buscara L, **Montazer-Torbati F**, Pechoux C, Costa J, Auguste A, **Pannetier M**, Pailhoux E, Vilotte JL, Le Provost F, **Chanat E**. Evaluation du rôle des gènes R-spondin au cours du développement de la glande mammaire. Journées de restitution des Crédits Incitatifs 2006-2007 du Département PHASE. 26-27 Novembre **2008**. Tours, France.

6.35 Kocer A, Pinheiro I, **Pannetier M**, Renault L & **Pailhoux E**. *R-spondin1* et *FOXL2* appartiennent à deux voies anti-testiculaires distinctes au cours de la différenciation ovarienne chez la chèvre. JAS du département PHASE, 22-24. Octobre **2007**. Tours, France.

6.36 Baron D, Batista F, Chaffaux S, Cocquet J, Cotinot C, Cribiu C, De Baere E, Guiguen Y, Jaubert F, Pailhoux E, **Pannetier M**, Vaiman D, Vigier B, Veitia R, **Fellous M**. Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. Symposium on Reproduction in Vertebrates and Man held in honor of Charles Thibault. Mars **2004**. France.

6.37 **Pannetier M**, Renault L, Cotinot C, Pailhoux E. Mise en évidence et caractérisation d'un troisième gène, PFOXic, régulé par la région PIS chez la chèvre. 5<sup>ème</sup> Atelier Détermination et Différenciation du Sexe. Septembre **2004**. Nancy, France

6.38 **Govoroun M**, **Pannetier M**, Tourlet S, Pailhoux E, Brillard JP, Cotinot C. L'homologue du gène FOXL2 chez le poulet. L'étude comparative des profils d'expression des gènes CFOXL2 et aromatase dans les gonades d'embryons de poulet après l'inversion sexuelle induite par un inhibiteur d'aromatase ou l'oestradiol. 5<sup>ème</sup> Atelier Détermination et Différenciation du Sexe. Septembre **2004**. Nancy, France.

- 6.39 Cotinot C, Pailhoux E, Mandon Pepin B, **Pannetier M**, Renault L, Magre S, Mazeaud S, Guignon C. Le modèle murin est-il représentatif des mammifères ? 5<sup>ème</sup> Atelier Détermination et Différenciation du Sexe. Septembre **2004**. Nancy, France.
- 6.40 Govoroun M, **Pannetier M**, Pailhoux E, Couty I, Brillard JP, Battellier F, Cotinot C. Further observations on the roles of FOXL2 in ovarian differentiation and function in the chicken. Workshop on Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry. **2003**. Berlin, Allemagne.

## Communications Affichées

7.1 Dewaele A, **Dujardin E**, Jammes H., Giton F., Mandon-Pépin B., Sellem E., André M., Albina A., Pailhoux E., Jolivet G., **Pannetier M**. Characterization of estrogen production and function in adult rabbit testes. 54th SSR Annual Meeting, Dec **2021**, Saint-Louis, United States

7.2 Mellouk N, Mandon-Pépin B, Dewaele A, Jouneau L, **Dujardin E**, Aubert-Frambourg, Jolivet G, Pailhoux E, **Pannetier M**. Single-cell RNA Transcriptome Atlas of the Developing Fetal Rabbit Ovary. 54th SSR Annual Meeting, Dec **2021**, Saint-Louis, United States.

7.3 Mellouk N, **Dujardin E**, Jolivet G, Dewaele A, Pailhoux E, **Pannetier M**. DMRT1 is Required for Fetal Germ Cell Development in Rabbit Ovary. 54th SSR Annual Meeting, Dec **2021**, Saint-Louis, United States.

7.4 Mellouk N, Mandon-Pépin B, Dewaele A, Jouneau L, **Dujardin E**, Aubert-Frambourg, Jolivet G, Pailhoux E, **Pannetier M**. Single-cell RNA Transcriptome Atlas of the Developing Fetal Rabbit Ovary. First Virtual International Symposium on Vertebrate Sex Determination, Oct **2021**, Kona, Hawaii, United States.

7.5 Mellouk N, **Dujardin E**, Jolivet G, Dewaele A, Pailhoux E, **Pannetier M**. DMRT1 is Required for Fetal Germ Cell Development in Rabbit Ovary. First Virtual International Symposium on Vertebrate Sex Determination, Oct **2021**, Kona, Hawaii, United States.

7.6 Jolivet G, Héroult E, Allais-Bonnet A, André A, Mandon-Pépin B, Jouneau L, Pailhoux E, **Pannetier M**. Différenciation et reprogrammation épigénétique de la lignée germinale – Analyses transcriptomiques à l'échelle de la cellule. Séminaire Défis Scientifiques du Département Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage, Novembre **2019**, Rennes, France.

7.7 Bertho S, Herpin A, Branthonne A, Jouanno E, Yano A, Nicol B, Muller T, **Pannetier M**, Pailhoux E, Miwa M, Yoshizaki G, Schartl M, Guiguen Y. Mécanisme d'action du gène déterminant majeur du sexe de la truite arc-en-ciel. Séminaire Défis Scientifiques du Département Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage. Novembre **2019**, Rennes, France.

7.8 Allais-Bonnet A, Messiaen S, André M, Mandon-Pépin B, Livera G, Schibler L, Jammes H, Pailhoux E, Kiefer H, **Pannetier M**. DNA methylation dynamics during spermatogenesis in ruminants. Mammalian Reproductive Gordon Research. Juillet **2018**, Lucca, Italy.

7.9 Bertho S, Herpin A, Dupin de Beyssat E, Yano A, Muller T, Nicol B, **Pannetier M**, Pailhoux E, Schartl M, Guiguen Y. The bizarre master sex determinant of salmonids triggers its action by directly hijacking the conserved gonadal differentiation pathway. 11<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Juin **2018**, Manaus, Brazil.

7.10 Mandon-Pépin B, Allais-Bonnet A, André M, Calvel P, Sellem E, Le Danvic C, Prezelin A, Jammes H, Pailhoux E, Kiefer H, **Pannetier M**. Epigenetic reprogramming in the male germ line of ruminants. France-Japan Epigenetics Workshop. Novembre **2017**. Paris, France.

- 7.11 **Gobé C**, Daniel-Carlier N, André M, Thepot D, Jolivet G, Pailhoux E, **Pannetier M**. *In vitro* studies of the distal regulation of FOXL2 expression by epigenome editing. 2<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du GdR Repro. Avril **2017**. France.
- 7.12 **Lesage Padilla A**, Reinaud P, Raliou M, Galio L, Bolifraud P, Giraud Delville C, Hussain Al-Gubory K, Charpigny G, Eozenou C, **Pannetier M**, Sandra O. Regulator and target genes of FOXL2 in bovine endometrium. Journée de l'ED419-Biosigne. Juillet **2017**. France.
- 7.13 Allais-Bonnet A, Mandon-Pépin B, André M, Pailhoux E, Prezelin A, Kiefer H, **Pannetier M**. Reprogrammation de la méthylation de l'ADN des cellules germinales au cours du développement testiculaire chez Capra Hircus. 3<sup>ème</sup> Journée de Séminaires du Département Phase sur l'Épigénétique : EpiPhase. May **2017**. Jouy-en-Josas, France.
- 7.14 Panneau B, **Mandon-Pépin B**, **Pannetier M**, Jouneau L, Cotinot C. Effects of low dose of bisphenol A on sheep fetal testis and ovary. 18<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Juin **2016**. France.
- 7.15 **Dubé D**, Kiefer H, Vitorino-Carvalho A, Aguirre-Lavin T, **Pannetier M**, Le Bourhis D, Ruffini S, Archilla C, Brochard V, Laffont L, Gall L, Jouneau L, Jammes H, Duranthon V. Difference in fibroblasts' ability to be reprogrammed by the oocyte cytoplasm: study of differential situation in bovine. 18<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Juin **2016**. France.
- 7.16 **Perrier JP**, Sellem E, Prezelin A, Gasselin M, Jouneau L, Piumi F, Al Adhami H, Weber M, Renard JP, Schibler L, Jammes H, **Pannetier M**, Kiefer H. Reprogrammation épigénétique des cellules germinales mâles de ruminants : résultats et perspectives. 2<sup>ème</sup> Réunion d'Animation épiphase. Mars **2016**. Saint-Pée sur Nivelles, France.
- 7.17 **Gobé C**, **El Zaiat M**, André M, Allais-Bonnet A, Pailhoux E, **Pannetier M**. Invalidation of *Dmxxl2* in female germ cells and fertility trouble. 1<sup>ères</sup> Journées du GdR 3606 Repro. Avril **2015**. Rennes, France.
- 7.18 **El Zaiat M**, **Gobé C**, Passet B, Meunier N, André A, Jouneau L, Congar P, Allais-Bonnet A, Pailhoux E, **Pannetier M**. *Dmxxl2* is involved in follicle formation in the mouse. 1<sup>ères</sup> Journées du GdR 3606 Repro. Avril **2015**. Rennes, France.
- 7.19 **Lesage Padilla A**, Eozenou C, Healey G, Shimizu T, Oudin JF, Vaiman D, Myamoto A, Sheldon M, Reinaud P, Charpigny G, **Pannetier M**, Sandra O. FOXL2 is a new progesterone-regulated gene in the endometrium. 1<sup>ères</sup> Journées du GdR 3606 Repro. Avril **2015**. Rennes, France.
- 7.20 **Sandra O**, **Lesage Padilla A**, Mauffré V, Healey G, Camous S, Shimizu T, Miyamoto A, Al Gubory KH, Constant F, Sheldon IM, Charpigny G, **Pannetier M**, Eozenou C. FOXL2 is a progesterone-regulated gene in ruminant endometrium. 4<sup>th</sup> Ovarian Club Meeting "Blasotcysts Development and the Process of Implantation". Novembre **2014**. Paris, France.
- 7.21 **El Zaiat M**, Allais-Bonnet A, André M, **Gobé C**, Pailhoux E, **Pannetier M**. Effects of *Dmxxl2* invalidation on murine ovaries. 5<sup>èmes</sup> Journées d'Animation Scientifique du département Phase (JAS Phase 2013). Octobre **2013**. Paris, France.
- 7.22 **Pannetier M**, Jouneau L, Klopp C, Laloë D, **El Zaiat M**, Sandra O, Devinoy E, Pailhoux E. Analyse à grande échelle des ARN non codants longs exprimés au cours de la différenciation gonadique chez le bovin. 5<sup>èmes</sup> Journées d'Animation Scientifique du département Phase (JAS Phase 2013). Octobre **2013**. Paris, France.
- 7.23 **Pannetier M**, Jouneau L, Klopp C, Laloë D, **El Zaiat M**, Sandra O, Devinoy E, Pailhoux E. Genome-wide analysis of long non-coding RNAs expression during gonad differentiation in bovine. EMBL Symposia The non coding genome. Octobre **2013**. Heidelberg, Germany.
- 7.24 **Eozenou C**, Vitorino-Carvalho A, Forde N, Giraud-Delville C, Gall L, Lonergan P, Auguste A, Charpigny G, Richard C, Hussain Al Gubory K, **Pannetier M**, Sandra O. Caractérisation du facteur de transcription

FOXL2 dans l'endomètre bovin au cours de la gestation précoce. Journée de l'ED419 – Biosigne. Septembre **2012**. France.

7.25 **El Zaiat M**, Klopp C, Jouneau L, Sandra O, Devinoy E, Thépot D, Pailhoux E, **Pannetier M**. Long non-coding RNAs and sex-differentiating genes in bovine. First Course on Non-Coding Genome. June 4-8, **2012**. Curie Institute, Paris, France.

7.26 **Pailhoux E**, **Pannetier M**, Thépot D, Jolivet G, Naciri I, Allais-Bonnet A, **El Zaiat M**, Harscoet, E, Daniel-Carlier N, Boulanger L, Gall L, Laffont L, Ruffini S, Le Bourhis D, Daniel N, Jouneau L, Cabau C, Klopp C, Le Provost F, Vilotte J-L, Crihiu E-P, Chadi S, Vilotte M, Passet B, Le Guillou S, Laubier J, Morgenthaler C, Makhzami S, Castille J, Polyte J, Chaboissier M-C, Chassot A-A, Grégoire E, Pauper E. GENIDOV : Gene network involved in ovarian development in goat and mouse. Séminaire AGENAE / GENANIMAL. 20-21 Mars **2012**, La Rochelle, France.

7.27 **Pannetier M**, Kocer A, Renault L, Vacherie B, Cattolico L, Barbe V, Thépot D, Pailhoux E. Long non-coding RNAs and chromatin modifications control long-range regulation of FOXL2, the key gene for ovarian differentiation in goat. Epigenetic and Developmental Programming Conference. March 21-22, **2011**. Newcastle, UK.

7.28 **Pannetier M**, Kocer A, Renault L, Vacherie B, Cattolico L, Barbe V, Thépot D, Pailhoux E. New long non-coding RNAs are associated with long-range regulation of FOXL2 in goats. The Non-Coding Genome-EMBO/EMBL Symposium. October 13-16, **2010**. Heidelberg, Germany.

7.29 **Montazer-Torbati F**, **Pannetier M**, Kocer A, Auguste A, Renault L, Pailhoux E. Étude de l'expression de la protéine SRY au cours du développement testiculaire chez le bouc. 3èmes Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage. Octobre **2009**. Tours, France.

7.30 **Auguste A**, Chassot A-A, **Pannetier M**, Grégoire E, Treier M, Pailhoux E, Chaboissier MC. *R-spondin1* and *Foxl2* double invalidation in mouse: toward an understanding of the molecular interactions between two major ovarian differentiating pathways. Fifth International Symposium on Vertebrate Sex Determination. April 20-24, **2009**. Kona, Hawaii, USA.

7.31 **Pannetier M**, Renault L, Baillet A, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Eric Pailhoux. Steroidogenesis in the early ovary in ruminants: What estrogens deal with? XIVth international workshop on the development and function of the reproductive organs. September 15-17, **2008**. Roma, Italy.

7.32 **Auguste A**, **Montazer-Torbati F**, Kocer A, **Pannetier M**, Renault L, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Pailhoux E. Goat as a Model for Studying R-Spondin Involvement in Ovarian Differentiation in Mammals. *Sex. Dev.*, 2, 279-280. XXth International Congress of Zoology, August 26-29, **2008**. Paris, France.

7.33 **Montazer-Torbati F**, Auguste A, **Pannetier M**, Kocer A, Renault L, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Pailhoux E. Development of a Goat-Specific anti-SRY Antibody: Preliminary Results on Goat SRY Protein Expression. *Sex. Dev.*, 2, 284-284. XXth International Congress of Zoology, August 26-29, **2008**. Paris, France.

7.34 **Pailhoux E**, **Pannetier M**, Renault L, **Montazer-Torbati F**, Auguste A, Boulanger L, Monnoye M, Le Bourhis D, Gall L, Heyman Y, Chavatte P, Crihiu E-P, Chadi S, Costa J, Vilotte M, Laubier J, Tilly G, Passet B, Le Provost F, Vilotte J-L, Chaboissier M-C, Chassot A-A, Grégoire E, Ranc F. TEGOD : Transgenic studies of Early acting Genes in Ovarian Development in mouse and goats. Séminaire AGENAE / GENANIMAL. 20-22 Octobre **2008**, La Rochelle, France.

7.35 **Auguste A**, **Montazer-Torbati F**, Kocer A, **Pannetier M**, Renault L, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Pailhoux E. Goat as model for studying ovarian differentiation in mammals. *Reproduction in Domestic animals* 43145-145. 16th International Congress on Animal Reproduction, July 13-17, **2008**. Budapest,

- 7.36 **Pannetier M**, Julien E, Schotta G, Sardet C, Jenuwein T, Feil R. Pr-Set7 and Suv4-20h1/h2 regulate H4 lysine-20 methylation at Imprinting Control Regions. Gordon Research Conference. August 5-10, **2007**. Plymouth, New Hampshire, USA.
- 7.37 **Pannetier M**, Tardat M, Fabrizio E, Sardet C, Feil R, Julien E. Exploring Histone H4 methylation functions in chromatin. Exploring chromatin in stem cells, January 23-24, **2007**. Montpellier, France.
- 7.38 **Pannetier M**, Delaval K, Wagschal A, Feil R. Imprinting perturbation in mouse hepatocarcinoma: Link between DNA methylation and histone methylation. Chromatin structure and function, Decembre **2006**. Punta Cana, Republique Dominicaine.
- 7.39 Kocer A, Vacherie B, Thépot D, Cattolico L, **Pannetier M**, Barbe V, Renault L, Cotinot C, Eric Pailhoux. Complete sequencing of this PIS locus in goats (500 KB) leads to the discovery of new PIS-regulated transcripts expressed in ovaries. 4<sup>th</sup> International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Mars, **2006**. Hawaii, USA.
- 7.40 Kocer A, Vacherie B, Thépot D, Cattolico L, **Pannetier M**, Barbe V, Renault L, Cotinot C, Pailhoux E. Sequencing of 500 kb encompassing the PIS locus in goat leads to the discovery of new PIS-regulated transcripts expressed in ovaries. Gene Regulation: From chromatin remodelling to transcription. **2005**. Paris, France
- 7.41 Besnard N, **Pannetier M**, Tilly G, Kocer A, Hudrisier M, Renault L, Costa J, Le Provost F, Vilotte JL, Pailhoux E. XX sex-reversal in mouse transgenic for 90kb fragment encompassing the goat SRY gene. 6<sup>th</sup> Transgenic Technology Meeting. **2005**. Barcelona, Espagne.
- 7.42 **Pannetier M**, Kocer A, Renault L, Cotinot C, Pailhoux E. Etude de la région PIS (Polled Intersex Syndrome) chez la chèvre comprenant 3 gènes impliqués dans la différenciation ovarienne. 1<sup>ères</sup> journées d'animation scientifique du Département PHASE de l'INRA. **2005**. Tours, France
- 7.43 **Pannetier M**, Cotinot C, Pailhoux E. From intersex goats toward the identification of a crucial locus involved in ovarian differentiation in mammals. XIII International Workshop on the Development and Function of the Reproductive Organs. **2004**. Copenhagen, Danemark.
- 7.44 **Pannetier M**, Serval N, Cotinot C, Pailhoux E. Expression d'un nouveau gène spécifique de l'ovaire localisé près du locus PIS chez la chèvre. 6<sup>ème</sup> Congrès des Jeunes Chercheurs d'Ile de France. Juin **2003**. Paris, France
- 7.45 **Pannetier M**, Serval N, Cotinot C, Pailhoux E. Ovarian-specific expression of a new gene located near the PIS locus in goats. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Avril **2003**. Hawaii, USA

---

## **SYNTHESE DES TRAVAUX DE RECHERCHE**

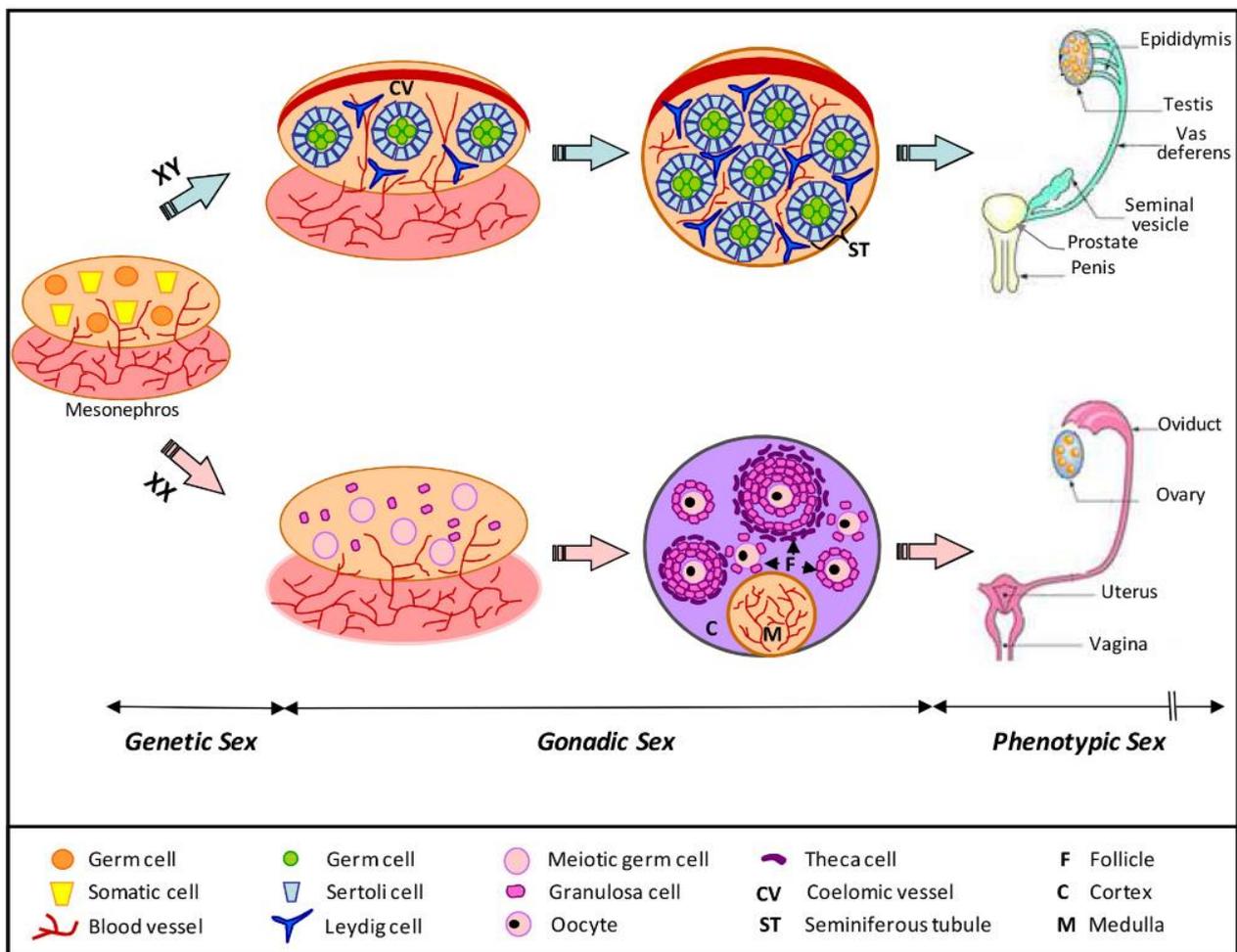
---

# I. SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE THÈSE

2001-2005

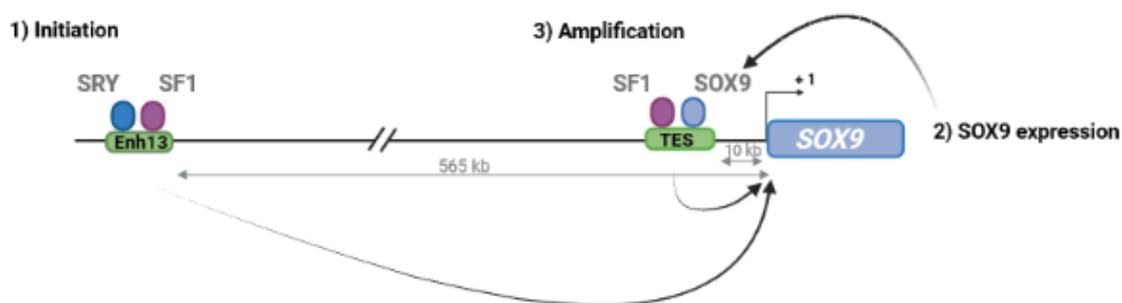
## A. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Chez les mammifères, la différenciation sexuelle se déroule en deux étapes : (i) la différenciation primaire qui conduit à la formation de gonades mâles ou femelles à partir de crêtes génitales indifférenciées (contrôle génétique de la différenciation du sexe) et (ii) la différenciation secondaire, contrôlée par les hormones gonadiques, qui aboutit à la mise en place des organes génitaux internes et externes de type mâles ou femelles (contrôle hormonal de la différenciation du sexe) (**figure 1**).



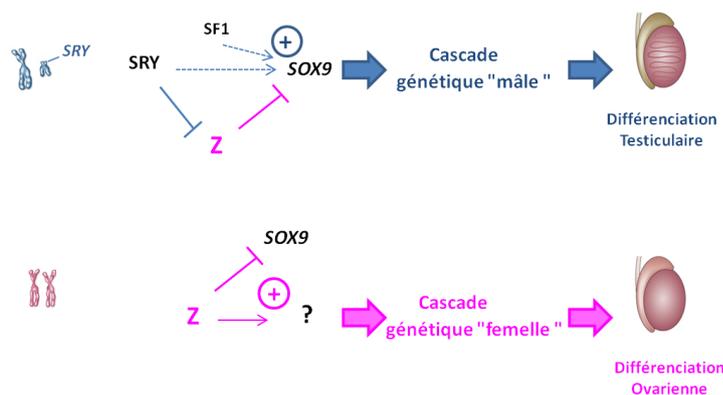
**Figure 1.** Représentation schématique simplifiée de la différenciation des gonades de mammifères. Le sexe génétique oriente le développement de la gonade bipotentielle vers un destin mâle (testicule) ou femelle (ovaire). Schématiquement, trois principaux types cellulaires sont observés dans les gonades en différenciation : les cellules somatiques de soutien, les cellules somatiques productrices de stéroïdes et les cellules germinales. Les cellules de soutien somatiques mâles et femelles ont une origine commune et se différencient respectivement en cellules de Sertoli et cellules de la granulosa. Les cellules stéroïdogènes se différencieront en cellules de Leydig dans les testicules et en cellules thécales dans les ovaires. Les caractéristiques spécifiques aux testicules comprennent la formation du vaisseau artériel coelomique et des cordons séminifères formés par les cellules de Sertoli qui entourent les cellules germinales XY qui entrent en quiescence avant de réaliser leur méiose au cours du processus de spermatogenèse à la puberté. Les caractéristiques spécifiques aux ovaires sont, dans un ordre chronologique : (i) l'entrée en méiose des cellules germinales XX, (ii) la formation de follicules ovariens (un ovocyte bloqué en prophase I entouré de cellules de la granulosa). En accord avec le sexe gonadique le sexe phénotypique se met en place avec la différenciation du tractus génital : épидидymes, canaux déférents, vésicules séminales, prostate et pénis chez les mâles ; oviductes, utérus et vagin chez les femelles (figure issue de (Allais-Bonnet and Pailhoux, 2014), adaptée de (DeFalco and Capel, 2009).

Lors de leur formation les gonades XX ou XY sont bipotentielles et vont se différencier en ovaire ou en testicule en fonction de la cascade génétique qui va être activée. Chez les individus XY, le gène *SRY* (Sex-determining Region of Y chromosome) porté par le chromosome Y constitue le déterminant testiculaire (Sinclair et al., 1990). Ce gène code pour un facteur de transcription capable d'activer l'expression d'un gène crucial pour l'initiation de la « cascade génétique mâle » le gène *SOX9* (SRY-related HMG box gene 9) qui peut à lui seul mimer l'action de *SRY* (Vidal et al., 2001). Bien que ce lien direct entre *SRY* et *SOX9* n'était encore qu'une hypothèse au démarrage de ma thèse en 2001, il a été démontré depuis. Ainsi, chez la souris, *SRY* se fixe au niveau d'une région régulatrice située à 565 kb du gène *Sox9* nommé « enhancer 13 » (Gonen et al., 2018). Dans un deuxième temps, un autre élément régulateur plus proche (à environ 10 kb, TES : Testis specific Enhancer of *Sox9*) est aussi impliqué dans l'amplification de son expression (Gonen et al., 2017; Sekido and Lovell-Badge, 2008) (**figure 2**).



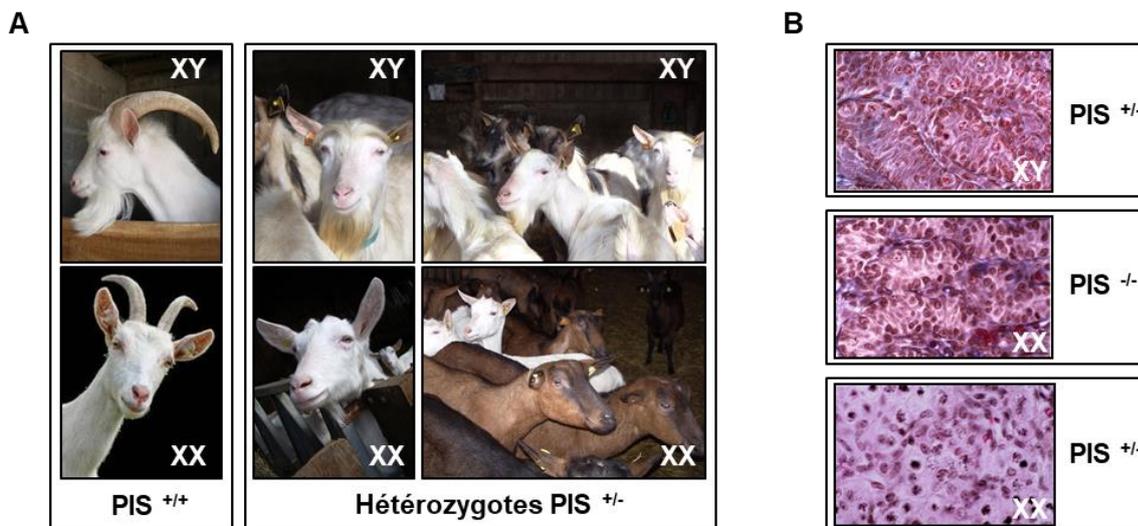
**Figure 2. Régulation de l'expression de *SOX9*.** L'initiation de l'expression de *SOX9* est assurée par *SRY* (et SF1, Steroidogenic Factor 1) au niveau d'une région régulatrice distale, l'enhancer 13 (Enh13). Une fois la transcription, puis la traduction de *SOX9* initiée, une deuxième région régulatrice apparaît cruciale pour obtenir un niveau optimal d'expression de *SOX9* : l'élément TES (Testis specific Enhancer of *SOX9*). *SOX9* peut se fixer sur cet élément et régule ainsi sa propre expression.

La protéine *SRY* est néanmoins très mal conservée, en particulier entre les rongeurs et les autres mammifères, et l'action de *SRY* pourrait être plus complexe chez certaines espèces. Plusieurs observations laissent penser qu'en plus d'un rôle activateur, *SRY* pourrait jouer un rôle répresseur, notamment sur les gènes femelles. Dès 1993, une hypothèse de travail basée sur un modèle de double répression avait été proposée (McElreavey et al., 1993). Ce modèle supposait l'existence de gènes répresseurs de la différenciation testiculaire (gènes Z) chez les individus XX, qui seraient la cible de *SRY* chez les mâles XY. Cette hypothèse reposait notamment sur la description d'anomalies du développement sexuel où des individus génétiquement femelles (XX) développent des testicules (inversions sexuelles mâles XX), sans translocation du gène *SRY*, mais suite à une perte de fonction d'un/de gène(s) Z (mutations récessives). Ces anomalies n'ont été observées que chez peu d'espèces (Homme, Chèvre, Porc, Cheval, Chien) et ne sont pas retrouvées chez les rongeurs (**figure 3**). Ainsi l'analyse de modèles "alternatifs" à la souris plus proche de ce qui pourrait se produire chez l'humain est particulièrement pertinente pour comprendre les mécanismes impliqués dans la détermination du sexe chez les mammifères.



**Figure 3. Hypothèse Z de la détermination du sexe chez les mammifères non murins.** Dans les gonades XY, en plus d'un rôle activateur, SRY aurait aussi pour fonction de réprimer un inhibiteur de la "cascade génétique mâle", nommé Z. Dans les gonades XX l'expression du gène Z permettrait d'inhiber l'expression de SOX9 et donc de réprimer l'activation de la cascade mâle : ce gène Z constitue un gène anti-testiculaire. Par ailleurs, Z pourrait promouvoir l'activation de gènes ovariens et la "cascade génétique femelle", permettant la différenciation ovarienne.

A l'époque où ont débutés mes travaux de thèse dans l'équipe **Détermination du Sexe et Différenciation des Gonades** (Direction C. Cotinot, UMR 1198 INRA/ENVA, BDR), la/les cible(s) moléculaire(s) de *SRY*, ainsi que son mode d'action exact n'étaient toujours pas identifiés. Ainsi, il était important d'étudier les gènes impliqués dans ces pathologies d'inversion sexuelle, car ils constituaient des gènes Z potentiels. Chez la chèvre, il existe une mutation naturelle appelée PIS pour Polled Intersex Syndrome qui associe une absence de développement des cornes (« Polled » ou chèvres « mottes ») à un phénotype d'inversion sexuelle mâles XX (Pailhoux et al., 2002) (**figure 4**).



**Figure 4. Syndrome PIS chez la chèvre. A. Phénotype crânio-facial.** Animaux cornus (*PIS* +/+) et sans cornes ou « mottes » (dès l'hétérozygotie, *PIS*<sup>-/-</sup>). La mutation existe chez différentes races de chèvres. Sont présentées les chèvres de notre (ex)élevage, de race Saanen (blanches) et Alpine (marrons). **B. Phénotype gonadique fœtal.** Coloration hématoxyline/éosine de coupes de gonades fœtales de 55 jpc (jours post conception). A ce stade, dans l'ovaire XX, les cellules germinales débutent leur méiose. Les gonades XX *PIS*<sup>-/-</sup> se développent comme des testicules. On observe la formation de cordons séminifères enfermant les cellules germinales en arrêt mitotique.

Début 2001, l'équipe de C. Cotinot a découvert la mutation impliquée (délétion de 11,7 Kb), ainsi que ses effets sur l'expression de deux gènes de la région, situés à 30 et 280 kb, et correspondant respectivement à un ARN non codant long, *PISRT1* (*PIS-regulated transcript 1*) et un facteur de transcription, *FOXL2* (*Forkhead box gene, family L, number 2*) (Pailhoux et al., 2001) (**figure 5**). Depuis, deux autres ARN non codants (ARNnc) longs ont été identifiés dans ce locus (Pannetier et al., 2005, 2012) et la mutation a été très récemment recharacterisée, montrant une complexité plus importante (voir **figure 7** page 36 pour la description) (résultats du laboratoire non publiés ; (Simon et al., 2020; Zhang et al., 2020)).

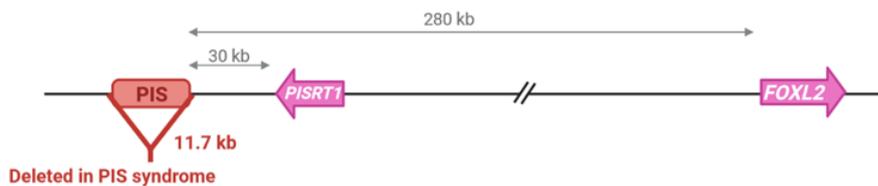


Figure 5. Représentation schématique du locus PIS et de la mutation chez la chèvre (Pailhoux et al., 2001). Le locus/la mutation PIS sont localisés sur le chromosome 1 de chèvre (1q43).

Quoiqu'il en soit, l'expression des gènes du locus PIS est réprimée dans les gonades des animaux XX homozygotes mutants (XX PIS<sup>-/-</sup>) ce qui conduit à l'activation de l'expression du gène *SOX9*, puis à celle de la cascade génétique mâle. **La question qui se posait lors de mon arrivée en thèse était de comprendre quel était le gène responsable de cette inversion sexuelle : *FOXL2* ou le(s) ARNnc associé(s) ?** Différents rôles ou modes d'action sont aujourd'hui décrits pour les ARNnc longs qui ont été classés en différentes catégories (pour revue (Statello et al., 2021)). Dans le cas des ARNnc longs du locus PIS, il est hautement probable que ces transcrits n'aient pas de fonction par eux-mêmes (Boulanger et al., 2008) mais que cette activité transcriptionnelle soit le signe de la présence d'éléments régulateurs (enhancers). Je reviendrai sur cet aspect plus loin dans le manuscrit (thèse de Clara Gobé). Nous savons aujourd'hui que c'est bien *FOXL2* qui est responsable du phénotype d'inversion sexuelle chez la chèvre, mais plus de dix ans auront été nécessaires pour en apporter la preuve et comprendre par quel moyen (Boulanger et al., 2014; Elzaïat et al., 2014) (thèse de Maëva Elzaïat et thèse de Emilie Dujardin). A mon arrivée au laboratoire en septembre 2001, très peu de choses étaient encore connues sur ce gène, son expression et ses fonctions. Simultanément aux travaux de l'équipe montrant l'implication de *FOXL2* dans le Syndrome PIS, ce gène avait aussi été identifié chez l'humain comme étant impliqué dans le syndrome BPES (*Blepharophimosis Ptosis Epicanthus inversus Syndrome*). Il s'agit d'un syndrome caractérisé par de nombreuses malformations palpébrales qui sont associées, dans le cas d'un BPES de type I, à une insuffisance ovarienne prématurée chez la femme (mutations hétérozygotes dans *FOXL2* ou délétions/translocation de régions alentours) (Crisponi et al., 2001). Chez la souris, l'étude de l'expression de *Foxl2* par hybridation *in situ* avait montré qu'il était exprimé dans les paupières en cours de formation, mais aussi dans l'ovaire au niveau des cellules de granulosa des follicules. D'après ces données, *FOXL2* semblait donc jouer un rôle important pour le développement et/ou le maintien de la fonctionnalité de l'ovaire. Lors de ma thèse intitulée « **Conservation, rôle et régulation de *FOXL2* un facteur clef de la différenciation ovarienne impliqué dans le syndrome PIS (Polled Intersex Syndrome) chez la chèvre** », je me suis attachée à décrire l'expression de *FOXL2* dans l'ovaire de différentes espèces (poulet, chèvre, souris) et à démontrer l'un de ces rôles dans le contrôle de la production d'estrogènes. Par ailleurs, en étudiant la régulation de son expression chez la chèvre, j'ai mis en évidence un nouvel ARNnc long (*PFOXic*), dont la conservation a été analysée chez la souris. Enfin *FOXL2* constituant un potentiel gène Z tel que décrit plus haut (figure 3), il pourrait être une cible de *SRY*, au moins chez la chèvre. Ainsi nous avons analysé la conservation du rôle de la protéine *SRY* caprine dans un contexte murin, par la création de souris transgéniques.

## B. PRINCIPAUX RESULTATS

### 1. Conservation de *FOXL2* chez le poulet (Govoroun et al., 2004)

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec une équipe de l'INRA de Nouzilly (Station de Recherche Aviaire, SRA). J'ai pu caractériser la protéine FOXL2 de poulet et étudier son expression au cours du développement de l'ovaire foetal ainsi que celle de l'enzyme P450 aromatase (enzyme responsable de la production d'estrogènes, dont la fonction est déterminante pour la différenciation ovarienne chez le poulet). L'étude de la localisation de ces deux protéines, couplée à une analyse transcriptomique de leur dynamique d'expression nous ont permis d'établir une corrélation entre l'expression de *FOXL2* et celle de l'*aromatase*.

### 2. Rôle de *FOXL2* au cours du développement précoce de l'ovaire de chèvre : Régulation de l'expression de l'*aromatase* (Pannetier et al., 2006a).

Lors de la différenciation de l'ovaire et avant l'entrée en méiose des cellules germinales XX, une expression de l'enzyme Aromatase et/ou une production d'oestrogènes ont été rapportées chez plusieurs espèces de mammifères non rongeurs (humains, ruminants, lapins) (George and Wilson, 1978; Mauleon et al., 1977; Milewich et al., 1977). A l'époque de mes travaux de thèse, le rôle des estrogènes dans l'ovaire de mammifère à ce stade était encore inconnu. Par contre, chez d'autres espèces de vertébrés comme le poulet (Vaillant et al., 2001) ou certains poissons (Guiguen et al., 1999), il avait été démontré que les estrogènes jouaient un rôle crucial dans la détermination du sexe femelle.

Chez la chèvre, l'aromatase (codée par le gène *CYP19A1*) est exprimée très tôt dans la gonade XX et c'est par ailleurs l'un des premiers gènes dont l'expression est affectée dans les gonades mutantes XX *PIS*<sup>-/-</sup>, consécutivement à l'absence d'expression de *FOXL2* (Pailhoux et al., 2002). Forts de ces observations et des études réalisées chez le poulet (Govoroun et al., 2004), nous avons donc postulé que FOXL2 pourrait être un régulateur de l'expression de l'Aromatase dans l'ovaire foetal précoce, avant l'entrée en méiose des cellules germinales. J'ai pu montrer l'existence d'une co-localisation des deux protéines dans des cellules somatiques de l'ovaire, puis par des expériences *in vitro*, que FOXL2 pouvait activer le promoteur de l'aromatase. Des expériences de CHIP sur des lignées de cellules de granulosa humaine (KGN) ont ensuite confirmé ce lien « *in vivo* », ainsi que la conservation de cette fonction chez l'humain. J'ai pu par ailleurs, montrer l'existence de plusieurs sous-populations de cellules de pré-granulosa dans l'ovaire foetal de chèvre. En effet au moins deux populations de cellules positives pour FOXL2 ont été observées : l'une exprimant l'aromatase, l'autre non. Ces résultats, surprenants à l'époque, sont tout à fait en accord avec les observations réalisées bien des années plus tard chez la souris, grâce notamment à l'avènement des techniques de transcriptomique single-cell (Niu and Spradling, 2020). Le rôle de cette synthèse d'estrogènes dans l'ovaire foetal de mammifère restait cependant en suspens et ce n'est que bien des années après que nous avons pu l'appréhender chez le lapin grâce à l'utilisation de technologies d'édition du génome (Jolivet et al., 2022) (voir page 62).

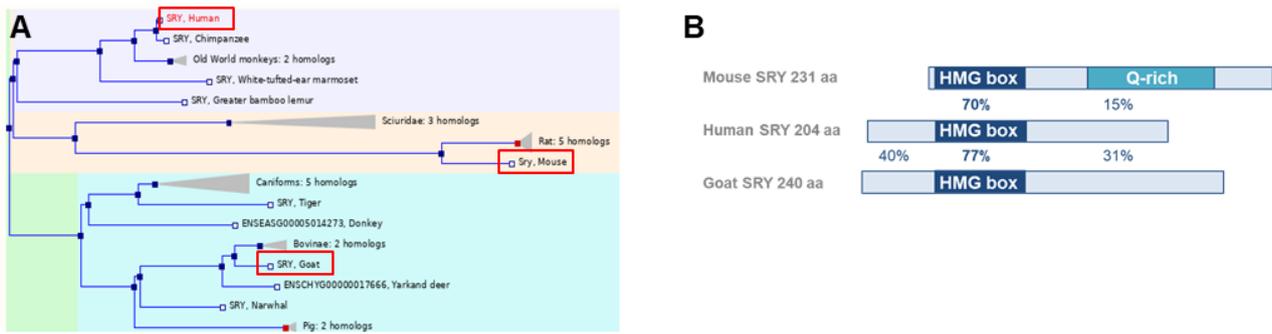
### 3. Régulation de l'expression de *FOXL2* (Cocquet et al., 2003; Pannetier et al., 2003, 2005)

La mutation PIS bien que localisée à 300 kb du gène *FOXL2* a un impact sur sa transcription. Une première étape au cours de ma thèse a été de m'intéresser au promoteur de *FOXL2*. J'ai pu mettre en évidence que celui-ci présentait une activité bidirectionnelle, contrôlant la transcription de *FOXL2* d'un côté et celle d'un ARNnc long de l'autre : *PFOXic* (*Promoter FOX inverse complementary*). La caractérisation puis l'étude de l'expression de ce transcrite montre que *PFOXic* est toujours co-exprimé avec *FOXL2*. Bien que la séquence de cet ARN ne soit pas conservée chez l'humain, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un transcrite dans la même région qui peut être considéré comme son équivalent (annoté depuis *FOXL2NB* pour *FOXL2 Neighbor* dans le génome humain). Il semble donc que l'activité bidirectionnelle du promoteur *FOXL2* soit conservée entre la chèvre et l'homme et nous avons postulé à l'époque que cette activité pourrait être nécessaire au contrôle du niveau d'expression transcriptionnel de *FOXL2* (mécanisme de « déversoir transcriptionnel ») (Pannetier et al., 2005). Depuis mes travaux de thèse, il a été montré que de nombreux gènes codants partageaient un promoteur bidirectionnel avec un ARNnc long. Il pourrait s'agir de créer localement un réservoir d'ARN polymérase II afin de limiter les variations stochastiques des niveaux d'expression du gène codant et/ou de promouvoir une activation rapide de son expression (Wei et al., 2011). Chez la souris, ce système n'apparaît pas être conservé. Néanmoins, en collaboration avec l'équipe de Reiner Veitia (Institut Cochin, INSERM U567) nous avons pu montrer l'existence d'un transcrite non codant, antisens au gène *Foxl2*, appelé *Foxl2os* (*Foxl2 opposite strand*). Cette activité transcriptionnelle antisens est toujours associée à la transcription de *Foxl2*. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la régulation/maintien de son expression chez la souris (Cocquet et al., 2003).

La conservation et l'expression de l'ARNnc long *Pisrt1* ont aussi été analysées dans l'espèce murine. Contrairement à ce qui a été observé chez la chèvre où l'expression de *PISRT1* et de *FOXL2* sont associées dans l'ovaire, il apparaît chez la souris que *Pisrt1* n'est transcrit qu'à l'âge adulte alors que *Foxl2* est exprimé dès le stade fœtal (Pannetier et al., 2003). Cette discordance avec le modèle caprin pourrait signifier que la région distale n'est que peu impliquée dans la régulation de l'expression de *Foxl2* dans l'ovaire de souris.

### 4. Conservation du rôle de la protéine SRY de chèvre chez la souris (Pannetier et al., 2006b)

Bien que *SRY* soit le gène déterminant pour la différenciation testiculaire chez les mammifères, sa séquence et sa structure protéique sont très mal conservées (**figure 6A et B**). En particulier la souris présente un domaine supplémentaire riche en glutamine (Q-Rich domain ou CAG repeat domain) qui apparaît nécessaire à l'activité de la protéine (la délétion de ce domaine empêche l'effet masculinisant de mSRY (mouse SRY) sur des fœtus XX de souris) (Bowles et al., 1999).



**Figure 3. Conservation du gène et de la protéine SRY à travers les mammifères. A. Arbre phylogénétique montrant l'éloignement de la souris par rapport aux autres. L'humain, la souris et la chèvre sont entourés en rouge. B. Conservation de la protéine SRY. Les pourcentages de conservations présentés ont été obtenus en comparant la protéine murine ou caprine à la protéine humaine qui sert de référence. Seul le domaine HMG est relativement conservé. HMG box : High Mobility Group box, domaine de liaison à l'ADN. Q-rich : domaine riche en Glutamine spécifique de la souris.**

Ainsi, chez la souris, SRY pourrait agir par des mécanismes biochimiques particuliers à cette espèce. Pour évaluer la conservation de la fonction de SRY malgré ces différences, nous avons surexprimé la protéine SRY de chèvre (gSRY, goat SRY) chez la souris (souris transgéniques pour un BAC caprin contenant le gène SRY, collaboration avec l'unité INRAE UR339) et nous avons pu montrer, que gSRY chez la souris induisait la différenciation de testicules chez les fœtus XX. Ainsi, même en absence d'un domaine CAG, gSRY peut activer *Sox9*, comme la protéine mSRY endogène. Des résultats similaires, bien que jamais officiellement publiés, avaient été obtenus lors de la surexpression de SRY humain chez la souris, corroborant nos conclusions ((Lovell-Badge et al., 2002), communication en congrès). Néanmoins, très récemment, une équipe japonaise a créé une lignée de souris transgénique chez laquelle la séquence de mSry endogène a été remplacée par la séquence du gène SRY humain (Tsuji-Hosokawa et al., 2022). Aucun effet masculinisant n'a été obtenu dans ces conditions. Dans nos modèles transgéniques, le nombre de copie du transgène est donc les niveaux d'expression de gSRY ou hSRY pourrait « forcer » le système et compenser l'absence de domaine transactivateur (glutamine riche). A l'aune de nos connaissances actuelles (cf [thèses de Fatemeh Montazer-Torbati](#), page 38 ; [Maëva Elzaiat](#), page 40 ; [Emilie Dujardin](#), page 48), nous pouvons poser l'hypothèse qu'au cours de l'évolution, la protéine SRY de souris a acquis de nouvelles fonctionnalités par rapport à celles d'autres mammifères, lui permettant d'agir seule, indépendamment de facteur(s) exprimé(s) dans les gonades en différenciation. Les autres protéines SRY dépourvues de ce domaine spécifique peuvent activer la cascade génétique mâle grâce à l'intervention d'un acteur supplémentaire dont la fonctionnalité dans la détermination testiculaire aurait été perdue chez la souris (i.e. DMRT1).

## CONCLUSION

Au cours de ma thèse je me suis intéressée à deux acteurs majeurs de la détermination du sexe et de la différenciation gonadique : FOXL2 pour l'ovaire, SRY pour le testicule. L'envie de comprendre comment ces facteurs de transcription régulent l'expression des gènes, mais aussi d'appréhender la façon dont leur propre expression peut être contrôlée, m'ont naturellement conduite à m'intéresser à la régulation de la structure de la chromatine et aux marques épigénétiques associées. J'ai donc poursuivi mon activité de recherche par

une expérience postdoctorale au sein d'une équipe spécialisée dans l'étude des mécanismes épigénétiques impliqués dans le contrôle de l'empreinte parentale. Cette équipe a notamment développé une technique d'analyse des marques d'histones à partir de chromatine native (Chromatin Immuno-Precipitation, CHIP), qui permettait à l'époque de travailler à partir d'une quantité modérée de matériel biologique (Umlauf et al., 2004).

## II. SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE POST-DOCTORAT

2005-2007

---

### A. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS

L'empreinte parentale est un phénomène épigénétique qui conduit à l'expression monoallélique de certains gènes suivant leur origine parentale. Pour chaque locus contrôlé par ce mécanisme, l'élément de contrôle de l'empreinte (Imprinting Control Region : ICR) est une courte région qui a la propriété d'acquérir une méthylation de l'ADN, uniquement dans une des deux lignées germinales. En cellules somatiques, la « lecture » de cette méthylation différentielle conduit à l'expression monoallélique du gène ou du groupe de gènes contrôlé par l'ICR correspondant (Delaval and Feil, 2004). Outre ces méthylation différentielles au niveau de l'ADN, des modifications épigénétiques au niveau des histones sont aussi associées aux ICR. Certaines modifications sont préférentiellement associées à l'allèle méthylé au niveau de l'ADN (H3K9me3, H4K20me3), alors que d'autres sont plutôt caractéristiques de l'allèle non méthylé (H3K4me2, H3K9ac) [Fournier *et al.*, 2002]. L'équipe de Robert Feil (IGMM, CNRS/Montpellier II UMR 5535) s'intéresse en particulier à ce type de modifications épigénétiques, au niveau des ICR et à leur implication dans le maintien de l'empreinte parentale (Umlauf *et al.*, 2004). Lors de mon postdoctorat, mon objectif d'étude était de comprendre les liens entre la méthylation de l'ADN et certaines modifications d'histones au niveau des régions de contrôle de l'empreinte. Mon projet consistait donc à analyser l'état épigénétique des ICRs (i) lorsque la méthylation de l'ADN est dérégulée (modèle *in vivo*) ou (ii) lorsqu'une modification d'histone, en particulier, est perturbée (modèle *in vitro*). Le modèle *in vivo* était basé sur l'induction de tumeur du foie chez la souris. Le faible taux d'obtention de tumeurs ainsi que leur grande hétérogénéité en termes de méthylation de l'ADN ne nous ont pas permis de conclure et cet aspect ne sera donc pas détaillé dans ce manuscrit. Le modèle *in vitro* m'a conduit à m'intéresser à une marque d'histone en particulier : H4K20me3. Cette marque épigénétique est associée à la méthylation de l'ADN au niveau des régions d'hétérochromatine constitutive (péricentrique et télomérique) et ses niveaux fluctuent en fonction des niveaux de méthylation de l'ADN génomique (Benetti *et al.*, 2007; Fraga *et al.*, 2005; Pogribny *et al.*, 2007; Schotta *et al.*, 2004). L'existence d'un lien entre la triméthylation de H3K9 et celle de H4K20 a par ailleurs été montré au niveau des séquences péricentriques (Schotta *et al.*, 2004) et ces deux marques épigénétiques sont justement associées à l'allèle méthylé des ICRs (Delaval *et al.*, 2007). Lors de mon arrivée dans le laboratoire de R. Feil, H4K20me3 apparaissait donc constituer une marque épigénétique d'intérêt pour étudier les interrelations entre les différentes marques épigénétiques pour le contrôle de l'empreinte parentale. Trois enzymes de la famille des protéines à domaine SET étaient alors connues comme pouvant être impliquées dans la méthylation de H4K20 : PR-SET7, décrite *in vitro* comme étant responsable de la mono-méthylation [Xiao *et al.*, 2005] et les SUV4-20H1 et H2 qui sont nécessaires à l'établissement/maintien de H4K20me3 au niveau des séquences péricentriques et des télomères (Benetti *et al.*, 2007; Schotta *et al.*, 2004). Mon objectif était

(i) de caractériser les enzymes responsables de la triméthylation de H4K20 au niveau des ICR et (ii) d'étudier l'impact d'une déplétion en H4K20me3 sur les autres marques épigénétiques.

## B. PRINCIPAUX RESULTATS

### Triméthylation de H4K20 au niveau des ICRs (Pannetier et al., 2008)

Grâce à une collaboration mise en place avec l'équipe de Thomas Jenuwein (IMP, Vienne, Autriche) nous avons pu obtenir des fibroblastes embryonnaires de souris doublement invalidés pour *Suv4-20h1* et *h2*. J'ai ainsi pu montrer que les SUV4-20H1/H2 étaient impliquées dans la mise en place de la marque H4K20me3 aux niveaux des régions de contrôle de l'empreinte. En effet, (i) les SUV4-20H1/H2 sont recrutées au niveau des ICR testées et (ii) en absence de ces enzymes, une diminution dramatique des niveaux de H4K20me3 est observée. *A contrario*, les niveaux de H4K20me1 augmentent, montrant (i) que la monométhylation de H4K20 est une première étape pour obtenir H4K20me3 et (ii) que les SUV4-20H1/H2 agissent comme des diméthylases. Ces observations ont été confirmées *in vitro* par des expériences de knock-down de *Pr-Set7* (impliquée dans la monométhylation de H4K20) où la diminution de H4K20me1 s'accompagne d'une diminution de H4K20me3. Ainsi l'établissement/le maintien de H4K20me3 au niveau des ICR nécessitent une cascade enzymatique impliquant PR-SET7 et SUV4-20H1/H2.

En absence de H4K20me3, la méthylation de l'ADN et l'expression allélique des gènes restent néanmoins inchangées. Ce maintien de l'empreinte pourrait être assuré par H3K9me3 dont les niveaux augmentent chez les KO *Suv4-20h1/h2*. Ces observations nous ont conduit à proposer l'hypothèse de l'existence d'un « cross-talk » entre l'histone H3 et l'histone H4 permettant une régulation en trans de la méthylation de leur résidus lysines K9 et K20 au niveau des ICR.

## CONCLUSION

Mon séjour postdoctoral de deux ans à l'IGMM, m'a permis d'enrichir mes connaissances sur les mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. De plus, j'ai pu acquérir de nouvelles compétences, notamment au niveau des techniques d'études de la chromatine et de la méthylation de l'ADN. Forte de ce nouveau bagage j'ai ensuite rejoint mon ancienne équipe de thèse, après la réussite du concours CR2 dans l'unité INRA Biologie du Développement et Reproduction à Jouy-en-josas.

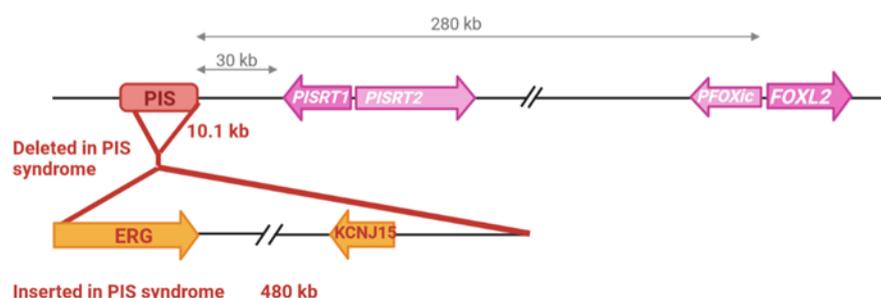
### III. SYNTHÈSE DES TRAVAUX RÉALISÉS À L'INRA/INRAE

DEPUIS 2008

#### A. RECRUTEMENT ET OBJECTIFS

L'intitulé de mon profil de recrutement supposait le développement d'études sur les "**Régulations géniques et les structures chromatinienne associées au cours du développement ovarien**". Mes objectifs concernaient principalement le gène *FOXL2* et je devais m'attacher à caractériser les mécanismes de régulation de son expression, mais aussi à déterminer son rôle dans l'ovaire de chèvre. Par ailleurs, l'étude de l'activation ou de l'inhibition de différents gènes en aval de *FOXL2*, pouvait conduire à s'intéresser au rôle de certains d'entre eux dans les gonades. La détermination/différenciation du sexe dépendant d'un fragile équilibre entre les niveaux d'expression des "gènes mâles" et des "gènes femelles", des projets portant sur des gènes majeurs de la différenciation testiculaire étaient également envisagés.

Dans les premières années, une partie de mon temps a été consacré à l'étude de la régulation de *FOXL2* dans le cadre de la mutation PIS chez la chèvre. J'ai repris de précédents travaux réalisés par un étudiant en thèse qui avaient montré l'existence d'une activité transcriptionnelle autour de la région mutée. J'ai pu mieux caractériser ces transcrits (ARNnc longs) en fonction des tissus et/ou des stades de développement, et commencer à décrypter l'état de la chromatine associée. Néanmoins, la nature même de la mutation PIS avait été remise en question dès ma première année de thèse en 2002, freinant la compréhension du fonctionnement du locus. Ainsi, mes résultats sur les ARNnc longs et la chromatine, bien qu'ayant fait l'objet de plusieurs communications orales ou affichées (congrès nationaux et internationaux), ont été laissés en suspens. Hormis l'explicitation de l'existence d'ARNnc longs nommés « PISRT2 » dans une synthèse publiée en 2012 (Pannetier et al., 2012), ces travaux n'ont pas été valorisés par une publication. En parallèle, plusieurs approches pour recharacteriser la mutation PIS ont été suivies par l'équipe, allant dernièrement jusqu'à la réalisation d'une banque de BAC à partir d'ADN mutant (*PIS*<sup>-/-</sup>). L'ensemble de ces études nous a permis de déterminer que la délétion était plus courte qu'initialement décrite (10,1 kb au lieu de 11,7 kb) et surtout qu'un fragment d'environ 500 kb correspondant à une duplication d'une région du chromosome 1 située à 20 Mb du locus s'était inséré à la place (**figure 7**).



**Figure 7. Locus PIS et recharacterisation de la mutation chez la chèvre.** [Pannetier et al., 2005 ; Pannetier et al., 2012 ; Simon et al., 2020]. *PISRT1*, *PISRT2* et *PFOXic* (annoté *FOXL2NB* chez l'humain) sont des ARN non-codant longs. *PISRT1/2* et *PFOXic/FOXL2* partagent un promoteur bidirectionnel. La mutation PIS consiste à la fois en une délétion d'une portion de 10.1 kb de la région nommée PIS et en une insertion

d'une séquence d'environ 480 kb correspondant à une duplication d'une partie du chromosome 1 comprenant les gènes *KCNJ15* et *ERG*. NB : l'expression de ces gènes a été étudiée au cours du développement des gonades fœtales. Nos résultats ne montrent pas d'implication de *KCNJ15* ou *ERG* dans le phénotype d'inversion sexuelle observé chez les *XX PIS*<sup>-/-</sup>.

Alors que nous allons affiner la description de la mutation, deux équipes différentes ont obtenus les mêmes résultats en utilisant des approches de séquençage haut débit. Leurs publications réalisées début 2020 (Simon et al., 2020; Zhang et al., 2020) ont rendu nos travaux obsolètes et ce sujet est actuellement à l'arrêt dans l'équipe. Je ne détaillerai pas plus nos résultats sur le fonctionnement du locus PIS chez la chèvre, mais je reviendrai sur la régulation à distance de *FOXL2* lors de la présentation des travaux de thèse de Clara Gobé réalisés chez la souris.

Dans la suite de ce manuscrit, je m'attacherai d'abord à décrire les travaux en lien avec les thèses des étudiantes que j'ai encadrées. Depuis 2008, avec mes quatre doctorantes successives, je me suis intéressée à la détermination du sexe et la différenciation des cellules de soutien mâle et femelle, en me concentrant sur les gènes *SRY* (Thèse de Fatemeh Montazer-Torbati), *FOXL2* (Thèse de Maëva Elzaïat ; Thèse de Clara Gobé) et *DMRT1* (Thèse de Emilie Dujardin). L'ensemble de ces aspects seront développés dans l'**AXE 1** de ce manuscrit intitulé : **Mécanismes Moléculaires impliqués dans la Détermination du Sexe**.

En parallèle de ces travaux, j'ai aussi pris de nouvelles orientations au cours de ces cinq dernières années en choisissant de m'intéresser à la **Différenciation de la Lignée Germinale** mâle et femelle chez les animaux d'élevage. Plusieurs projets sur cette thématique ont été développés et seront détaillés dans l'**AXE 2**. Ces travaux ouvrent vers la compréhension de l'épigénome des cellules germinales et potentiellement sur les mécanismes de transmission intergénérationnelle des phénotypes, ce qui peut constituer des perspectives d'avenir pour l'équipe.

La diversification de mes thématiques de recherche au cours du temps a été rendue possible (i) par la prise en charge de certains projets par mes étudiantes (doctorantes et masters), (ii) par l'obtention de différents financements de l'ANR, de la société APIS-GENE ou du département PHASE de INRAE, et plus récemment (iii) grâce au recrutement de personnel technique dans l'équipe (une assistante ingénieure et une ingénieure d'étude en 2020) et d'une nouvelle jeune chercheure (2021) dont je supervise les travaux. Ces différents aspects seront présentés au sein de leurs axes scientifiques respectifs détaillés ci-dessous.

## B. AXE 1

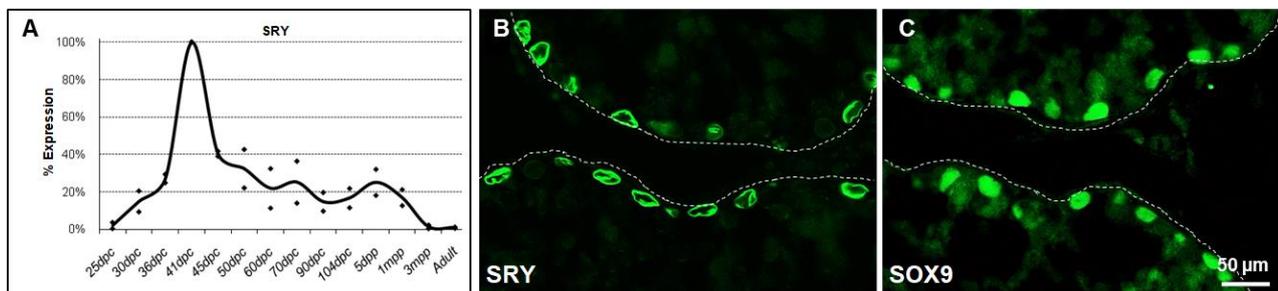
### MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA DETERMINATION DU SEXE

Les différents résultats obtenus sont présentés de façon chronologique en relation avec les sujets de thèses de mes quatre doctorantes.

#### 1. Étude de l'expression de la protéine SRY au cours du développement testiculaire chez le bouc.

Thèse de Fatemeh Montazer-Torbati (2008 – 2010) (Montazer-Torbati et al., 2010)]

Chez la plupart des mammifères, SRY constitue le facteur déterminant pour la différenciation du testicule. Néanmoins, SRY est peu conservé en termes de séquence (ADN et protéine) et sa cinétique d'expression est différente entre la souris (restreinte à 2 jours) (Bullejos and Koopman, 2001) et les autres mammifères (expression jusqu'à l'âge adulte) (Clépet et al., 1993; Daneau et al., 1995; Díaz-Hernández et al., 2008; Payen et al., 2002). L'identité protéique de SRY étant très divergente, un anticorps spécifique doit être développé pour chaque espèce. Nous avons donc produit et caractérisé un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine SRY de chèvre (« goat SRY », gSRY). Les analyses de l'expression cellulaire de gSRY au cours du développement du testicule montrent que son expression dans les cellules de Sertoli est maintenue jusqu'à l'âge adulte (**Figure 8**). Par ailleurs, sa localisation subcellulaire est particulière, puisqu'on peut détecter la protéine SRY à la périphérie du noyau (colocalisation avec la lamine B, composant de la membrane interne du noyau (Montazer-Torbati et al., 2010)) (**Figure 8B**).

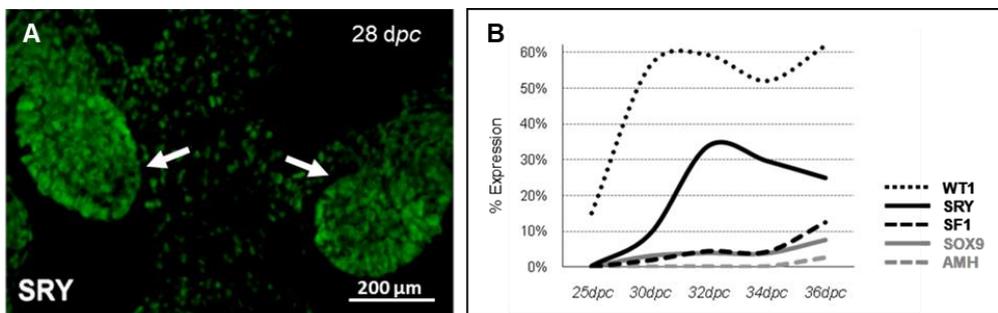


**Figure 8. Expression de SRY au cours du développement testiculaire dans l'espèce caprine.** A. Cinétique d'expression de SRY au cours du développement fœtal et postnatal dans le testicule de bouc (RT-qPCR). Une chute importante des niveaux d'expression détectés à partir d'un testicule entier est observé à partir de 3 mpp, lorsque les cellules germinales ont initié la spermatogenèse et que ce type cellulaire devient majoritaire dans la gonade mâle. NB : la durée de développement *in utero* est de 150 jours ; la puberté débute entre 2 et 3 mois après la naissance et l'animal peut être mis à la reproduction à partir de l'âge de 6/7 mois. dpc : days post conception ; mpp : months post conception. B, C. Immunodétection des protéines SRY et SOX9 sur coupe de testicules adultes. Les tubes séminifères sont délimités par des pointillés.

La présence d'un facteur de transcription dans ce compartiment du noyau est à relier avec sa fonction (Heessen and Fornerod, 2007). Si ce facteur agit plutôt comme un répresseur, sa localisation à la périphérie du noyau crée un environnement répressif pour ses gènes cibles (compartiment d'hétérochromatine). Ainsi la localisation de SRY chez l'adulte pourrait témoigner de son rôle de répresseur sur les gènes femelles tel que postulé par « l'hypothèse Z » (McElreavey et al., 1993). Si ce facteur agit plutôt comme un activateur, sa séquestration loin de ses gènes cibles peut constituer un moyen de l'empêcher d'agir et/ou de constituer une « réserve ». Ainsi, une autre hypothèse pourrait être que SRY est stocké à la périphérie (mis en « stand-

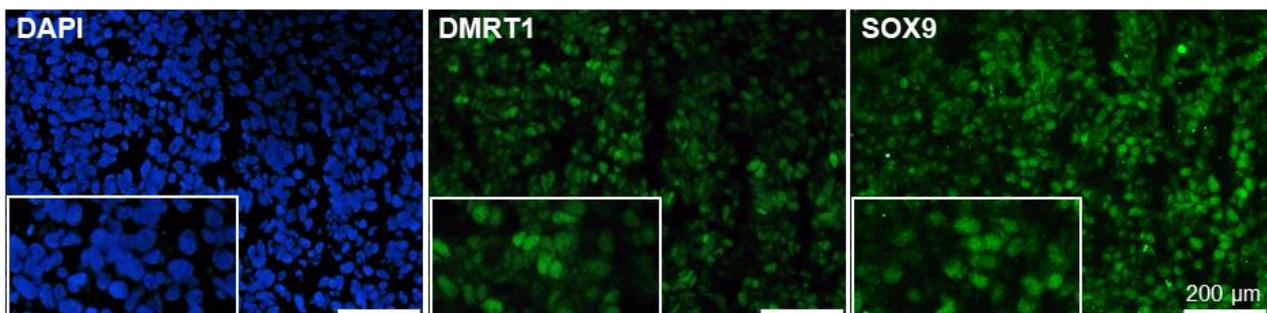
by »), au cas où il serait nécessaire qu'il pallie à la défaillance d'un autre facteur. Dans les deux cas, il s'agirait d'assurer le maintien des caractéristiques des cellules de Sertoli tout au long de la vie de l'individu. SRY serait donc d'abord à l'avant-garde, puis à l'arrière garde de la cascade génétique mâle chez certains mammifères comme le bouc. La souris apparaît n'avoir conservé qu'un rôle initiateur pour SRY, la fonction de maintenance étant assurée à l'âge adulte par d'autre facteur (cf DMRT1 (Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1) (Matson et al., 2011)).

Une autre différence majeure avec l'espèce murine a été observée lors du développement fœtal, dès la formation des crêtes génitales. Chez les caprins en effet, l'expression de SRY peut être détectée dans toutes les cellules de la gonade XY en différenciation (**figure 9A**) et ceci très en amont de la primo expression du gène *SOX9* (**figure 9B**).



**Figure 9. Expression de SRY au cours de la détermination du testicule dans l'espèce caprine.** A. Immunodétection de la protéine SRY à 28 jours post conception. Les flèches blanches montrent les gonades encore morphologiquement indifférenciées. NB : les crêtes génitales apparaissent vers 25 jpc, puis les cordons séminifères se forment entre 34 et 36 jpc dans la gonade XY. B. Cinétique d'expression de différents marqueurs des précurseurs des cellules de soutien, puis des cellules de Sertoli, entre la formation des crêtes génitales (25 jpc) et l'apparition des cordons séminifères (36 jpc) (RT-qPCR).

Ainsi, l'expression de SRY ne semble pas suffire à l'activation de l'expression de *SOX9* dans les précurseurs des cellules de Sertoli. Un facteur supplémentaire entre en jeu pour permettre à SRY d'exercer sa fonction dans l'allumage de la cascade génétique mâle. A la fin de la thèse de Fatemeh, plusieurs candidats étaient envisagés (FGF9/FGFR2, DAX1, SF1) dont le plus prometteur était DMRT1 (**figure 10**).



**Figure 10. Immunodétection de DMRT1 et SOX9 dans un testicule fœtal caprin à 34 jpc** Les expériences préliminaires réalisées par Fatemeh montrent que l'expression de SOX9 et de DMRT1 est restreinte à un type cellulaire (Sertoli ?). NB : A ce stade précoce, les cellules de Sertoli ne sont pas encore organisées en cordons séminifères (observables à partir de 36 jpc). Le marquage au DAPI permet d'observer les noyaux des cellules présentes sur la coupe.

A l'époque, DMRT1 était pressenti comme étant le gène la détermination testiculaire chez certains vertébrés comme le medaka (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002) ou le poulet (Smith et al., 2009). Chez la souris,

bien que DMRT1 soit exprimé très tôt lors de la différenciation testiculaire, il n'apparaissait pas jouer de rôle dans la détermination/différenciation de la gonade fœtale, mais plutôt après la naissance, pour la fertilité des mâles (Raymond et al., 2000). Son rôle dans la détermination du sexe chez les mammifères était alors plutôt négligé. La suite de nos études chez la chèvre, puis chez le lapin montrera pourtant qu'il s'agit d'un facteur crucial pour la détermination du sexe mâle. L'indice suivant viendra de l'étude des mutants PIS chez la chèvre où nous recherchions à comprendre comment l'absence d'expression de *FOXL2* dans des gonades XX pouvait conduire à la différenciation de testicules.

## 2. Cibles et voies de signalisation régulées par FOXL2 au cours de la morphogenèse ovarienne précoce. Master 2 (2011) et Thèse de Maëva Elzaïat (2011-2015) (Elzaïat et al., 2014) Financement ANR GENIDOV

C'est au cours du stage de M2, puis de la thèse de Maëva Elzaïat, que nous avons pu appréhender les réseaux géniques activés et inhibés par FOXL2 dans les gonades fœtales de chèvre. Pour cela, Maëva a étudié des animaux mutants XX PIS<sup>-/-</sup>, en considérant qu'il s'agissait de « mutants naturels de *FOXL2* ».

Mais en parallèle des travaux de Maëva, pour prouver la validité du modèle PIS, notre équipe s'est attachée pendant plusieurs années à réaliser le KO du gène *FOXL2* chez la chèvre. Apporter cette preuve était d'autant plus important, que les études fonctionnelles chez la souris avaient conclu que *Foxl2* ne jouait aucun rôle dans l'ovaire fœtal, sa fonction étant limitée à la folliculogenèse (Schmidt et al., 2004; Uda et al., 2004). Néanmoins, l'invalidation de *Foxl2* à l'âge adulte induit une transdifférenciation des cellules de la granulosa en cellules de type Sertoli, montrant que FOXL2 est un gardien de l'identité ovarienne chez la souris (Uhlenhaut et al., 2009). Pour invalider *FOXL2* chez la chèvre, différentes stratégies ont été suivies dès 2008. Finalement, l'utilisation de Zinc Finger Nucléases ciblant spécifiquement *FOXL2* nous a permis d'obtenir plusieurs fœtus mutants, dont un fœtus XX *FOXL2*<sup>-/-</sup> (Boulangier et al., 2014). Nous avons ainsi pu montrer qu'en absence de protéine FOXL2 fonctionnelle, les gonades XX interrompent le programme femelle pour s'orienter vers un programme génétique mâle, induisant la différenciation de testicules XX et la masculinisation du tractus génital interne et externe. Ainsi **FOXL2 est un déterminant de l'ovaire.**

C'est la première fois qu'une telle démonstration est réalisée chez un mammifère. Ceci confirme aussi que chez les mutants XX PIS<sup>-/-</sup>, c'est bien l'absence d'expression de *FOXL2* qui est responsable de l'inversion du sexe. Ainsi l'étude de ces mutants est particulièrement pertinente pour décrire les voies régulées par FOXL2 dans l'ovaire fœtal. Dans ce but, des analyses transcriptomiques haut-débit ont été entreprises (RNA-sequencing), pour comparer le contenu transcriptomique i) de gonades intersexuées XX PIS<sup>-/-</sup> à celui ii) d'ovaires XX et iii) de testicules XY, à un stade très précoce de différenciation (36 jpc, cf ANNEXE 1 p96 pour une chronologie comparée de la différenciation de l'ovaire de souris, chèvre et lapin). A ce stade, les gonades intersexuée (IS) XX PIS<sup>-/-</sup> n'expriment pas encore SOX9 et les gènes dont l'expression est dérégulée

constituent des cibles potentielles de FOXL2. La séquence du génome caprin étant encore inconnue à l'époque, notre stratégie a été de créer notre propre banque de référence, en réalisant un séquençage long de l'ensemble des transcrits exprimés dans des testicules et des ovaires de 36 jpc (Séquenceur Roche 454). Les courtes séquences obtenues par RNA-sequencing pour les trois génotypes ont ensuite été alignées sur cette base de données, puis comptées. Les analyses différentielles (DEseq), réalisées au cours de la thèse de Maëva, montrent 163 gènes dont l'expression est dérégulée entre des gonades IS (XX PIS<sup>-/-</sup>) et des gonades femelles : 15% voient leur expression diminuer (gènes dont l'expression est activée par FOXL2), 85% augmenter (gènes dont l'expression est réprimée par FOXL2) (**figure 11**).

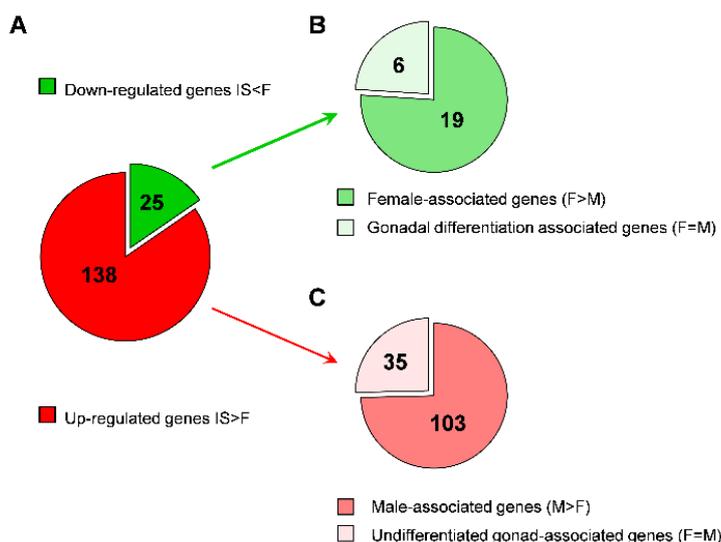
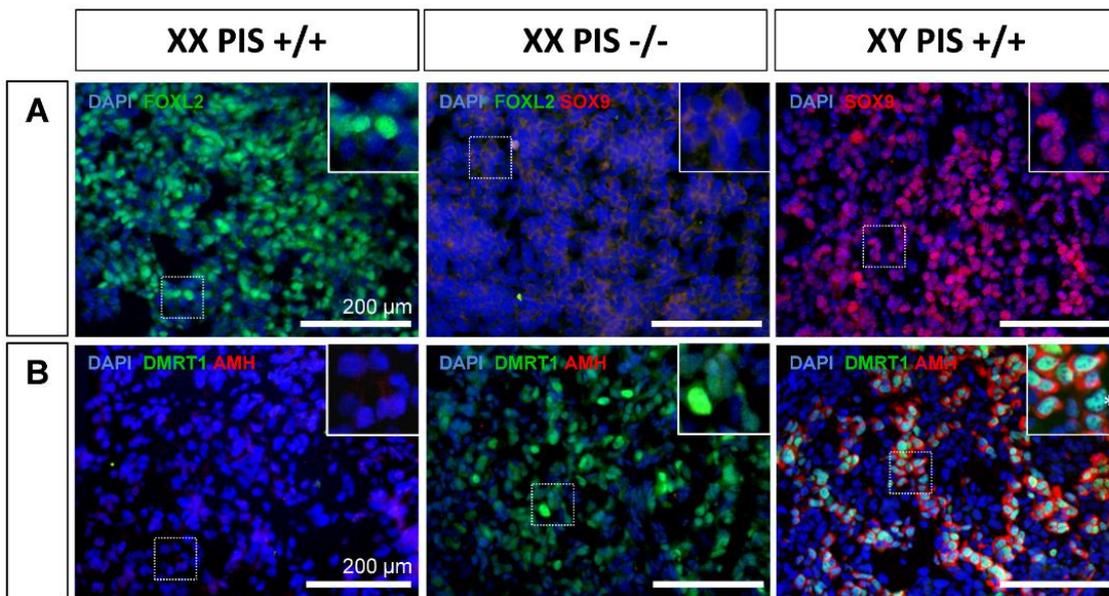


Figure 11. Gènes dont l'expression est dérégulée en absence d'expression de FOXL2 dans des gonades XX PIS<sup>-/-</sup> à 36 jpc. A. 163 gènes présentent une expression dérégulée entre les gonades intersexuées (IS) et les ovaires contrôles (Femelles, F) : 25 ont une expression qui diminue (IS<F, en vert) et 138 qui augmente (IS>F, en rouge). B. Parmi les 25 gènes dont l'expression diminue, 19 sont préférentiellement exprimés dans les ovaires (Female-associated genes, fold induction F/M>1.5) et 6 présentent une expression similaire entre gonades mâles et femelles (gènes associés à la différenciation gonadique, F=M). C. Parmi les 138 gènes dont l'expression augmente, 103 sont préférentiellement exprimés dans les gonades mâles (Male-associated genes, fold induction M/F >1.5) et 35 présentent une expression similaire entre gonades mâles et femelles (gènes associés à un état partiellement indifférencié des gonades IS, F=M). pValue ajustée = 0.05. Figure issue de Elzaiat et al., 2014.

FOXL2 activerait l'expression de plusieurs gènes de l'ovaire (*CYP19A1*, *ESR2*, *FST*, *RSPO2*...), mais il serait surtout un inhibiteur de la différenciation testiculaire. Il apparaît limiter la synthèse d'androgènes (répression de *CYP17A1*, *CYP11A*, *17βHSD3*), protéger les cellules germinales pour qu'elles puissent préparer la méiose (inhibition de *CYP26B1*) et prévenir l'activation de la cascade génétique mâle dans les cellules de soutien (répression de *DMRT1*).

Les analyses d'immunodétection réalisées par Maëva montrent qu'en absence de FOXL2, l'expression de DMRT1 augmente dans certaines cellules somatiques, d'abord négatives pour SOX9 et l'AMH (cible directe de SOX9 et témoin de la différenciation de cellules de Sertoli) (**figure 12**), puis positive pour ces deux marqueurs (dès 40 jpc, voir Elzaiat et al., 2014).



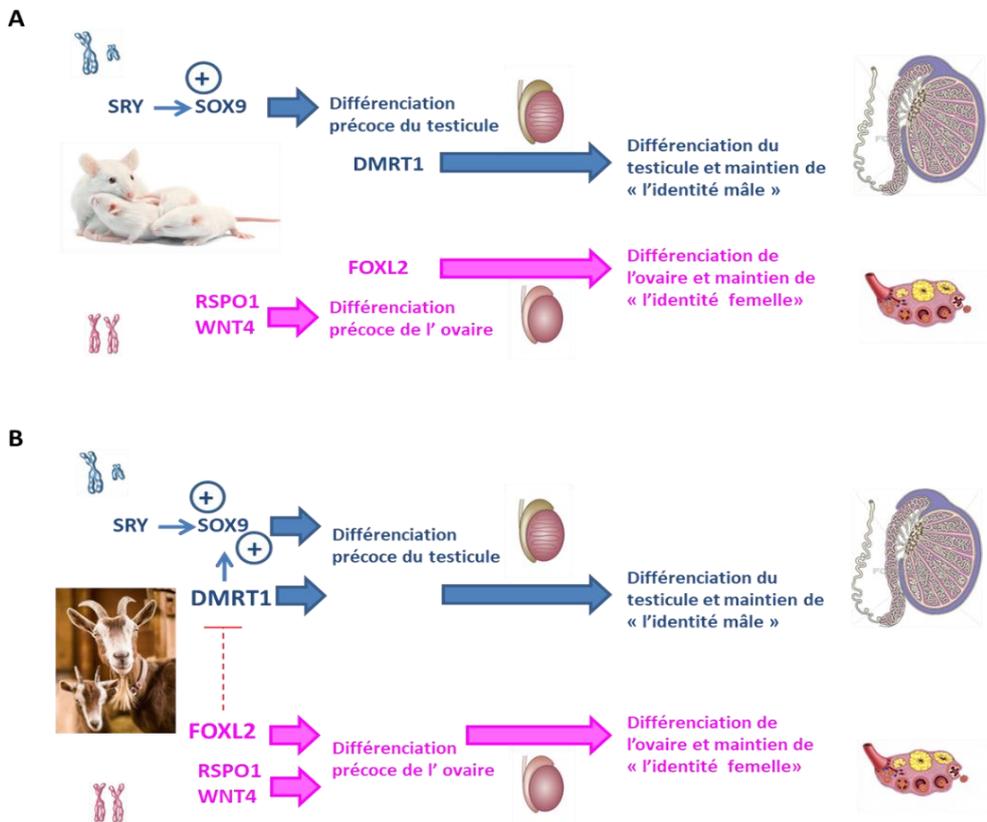
**Figure 12.** Analyse par immunofluorescence de l'expression de marqueurs de la détermination du sexe dans l'ovaire, la gonade intersexuée et le testicule à 36 jpc. **A.** Dans la gonade intersexuée XX PIS<sup>-/-</sup> aucun marquage ne peut être obtenu pour FOXL2 ou SOX9, contrairement à l'ovaire XX PIS<sup>+/+</sup> où les cellules de pré-granulosa sont marquées par FOXL2 (vert) ou le testicule XY PIS<sup>+/+</sup> où les cellules de Sertoli sont positives pour SOX9 (rouge). **B.** L'expression de DMRT1 peut être observée dans la gonade XX PIS<sup>-/-</sup> (vert), alors que la différenciation de cellules de Sertoli, signalée par un marquage AMH (rouge) ne s'est pas encore faite. Dans le testicule XY, les cordons séminifères sont en cours de formation : les cellules de Sertoli sont visualisées grâce au marquage cytoplasmique rouge (AMH) et nucléaire vert (DMRT1). Dans l'ovaire XX PIS<sup>+/+</sup>, on ne détecte pas d'expression de DMRT1 à ce stade. \*Quelques cellules germinales commencent aussi à exprimer DMRT1 dans le testicule.

*DMRT1* est un facteur de transcription dont le domaine de liaison à l'ADN (domaine DM) est bien conservé au cours de l'évolution. Comme dit plus haut, *DMRT1* agit comme un déterminant testiculaire chez différentes espèces de vertébrés (Matsuda et al., 2002; Smith et al., 2009; Yoshimoto et al., 2010) et peut donc activer la cascade génétique mâle dans les gonades. Bien que chez la souris l'inactivation de *Dmrt1*, n'apparaît avoir un effet qu'après la naissance (Raymond et al., 2000), le laboratoire de David Zarkower montre que la surexpression de *DMRT1* dans un ovaire fœtal de souris conduit à l'inhibition de *Foxl2* et à l'activation de l'expression du gène *Sox9* (Lindeman et al., 2015). Quelques années auparavant, cette équipe montrait que l'ablation conditionnelle de l'expression de *Dmrt1* dans des cellules de Sertoli adultes conduisait à la diminution de l'expression de *Sox9* et à l'augmentation de celle de *Foxl2*, faisant de *DMRT1* un gardien de l'identité testiculaire (Matson et al., 2011). Il apparaît donc que le lien entre *DMRT1* et l'expression de *SOX9* soit quand même conservé chez la souris.

Chez l'humain, quelques cas de dysgénésie gonadique 46 XY ou de différenciation d'ovotestis 46 XY ont été associés à des mutations impliquant *DMRT1*. Il s'agit cependant de délétions de portions du chromosome 9 pouvant supprimer *DMRT1* et l'un de ces gènes voisins (*DMRT2* ou *DMRT3*) (Bennett et al., 1993; Veitia et al., 1997), ou bien plusieurs exons et introns du gènes *DMRT1* (Ledig et al., 2012), ne permettant pas de déterminer si *DMRT1* seul pouvait être responsable des phénotypes observés. Juste après la parution de notre article, une publication a rapporté une mutation ponctuelle de *DMRT1* chez une femme XY (Murphy et al., 2015). La patiente est parfaitement féminisée et possède des ovaires en bandelettes fibreuses (cas de dysgénésie testiculaire complète). Elle porte une mutation hétérozygote de *DMRT1* (R111G) au niveau du

domaine DM qui affecte l'affinité et la spécificité de liaison à l'ADN de la protéine. De plus, la protéine DMRT1 R111G perturbe la stœchiométrie de fixation de la protéine DMRT1 sauvage sur ses cibles et agit alors comme un dominant négatif. Ainsi, l'existence de ce cas montre que DMRT1 est nécessaire à la différenciation testiculaire très précocement chez l'humain, comme ce que suggèrent nos résultats dans l'espèce caprine.

Les différences entre le modèle connu chez la souris et celui que nous proposons chez la chèvre est résumé ci-dessous figure 13).



**Figure 13. Principaux gènes impliqués dans la détermination du sexe. A. Détermination du sexe chez la souris.** Le gène *Sry*, porté par le chromosome Y est le déterminant du testicule. *SRY* active l'expression de *Sox9* qui contrôle la cascade de différenciation des cellules de soutien mâles (cellules de Sertoli). Dans les gonades XX, *Rspo1/Wnt4* (voie  $\beta$ -caténine canonique) sont impliqués dans la différenciation précoce de l'ovaire (Chassot et al., 2008; Vainio et al., 1999). Les gènes *Dmrt1* dans le testicule et *Foxl2* dans l'ovaire sont impliqués dans des processus de différenciation plus tardifs et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'identité mâle ou femelle des cellules de soutien (gardiens de l'identité sexuelle). **B. Détermination du sexe chez la chèvre.** Les gènes *DMRT1* et *FOXL2* jouent un rôle beaucoup plus précoce dans la détermination et la différenciation du testicule et de l'ovaire respectivement. Les études réalisées montrent que *FOXL2* inhibe l'expression de *DMRT1* dans les cellules somatiques de la gonade XX. Nous posons l'hypothèse que *DMRT1* est impliqué avec *SRY* dans l'activation de l'expression de *SOX9* dans une gonade XY, et ainsi dans la différenciation des cellules de Sertoli, puis du testicule.

Suite à ces travaux, pour démontrer le rôle de DMRT1 dans la détermination testiculaire chez une autre espèce que la souris, notre équipe a entrepris de réaliser le KO du gène *DMRT1* chez le lapin. Le phénotype gonadique de lapins KO pour *DMRT1* est actuellement étudié par [Emilie Dujardin](#) (doctorante) pour l'aspect testiculaire, ainsi que par [Namy Mellouk](#) (jeune chargée de recherche) pour l'effet dans l'ovaire. Si vous souhaitez poursuivre le fil de l'histoire de *DMRT1* dans notre laboratoire, vous pouvez directement aller au paragraphe II.4, page 48 ([thèse de Emilie Dujardin](#)). Mais cela supposerait d'omettre plusieurs années de recherche... L'établissement de lignées génétiquement modifiées chez le lapin est particulièrement long, et

en guise d'interlude nous nous sommes intéressés au rôle d'autres gènes dont l'expression pourrait être cette fois activée par FOXL2. Notre attention s'est ainsi focalisée sur le gène *DMXL2*, dont le rôle chez la souris a été étudié lors de la [thèse de Clara Gobé](#). En parallèle, Clara s'est aussi intéressée à la régulation de l'expression de *FOXL2* chez la souris notamment d'un point de vue épigénétique.

### **3. Régulation épigénétique de l'expression de *FOXL2* et voies activées en aval de ce gène dans la gonade. Master 1 (2013), Master 2 (2014) et Thèse de Clara Gobé (2014–2018).**

**Financements ANR GENIDOV (fini en 2015) et CI du département PHASE**

#### **3.1. Rôle de *DMXL2* dans les gonades de souris (Gobé et al., 2019)**

L'intérêt pour le gène *DMXL2* est né suite aux travaux de thèse de Maëva Elzaiat qui a montré que *DMXL2* était exprimé en aval de FOXL2 dans l'ovaire fœtal de chèvre. *DMXL2* code pour une protéine plateforme à domaines WD40 (domaines formés par de nombreuses répétitions d'un motif protéique d'environ 40 acides aminés se terminant par un dipeptide Tryptophane (W) – Aspartate (D)). Au début de notre étude, très peu de données étaient disponibles dans la littérature, mais il avait été montré que *DMXL2* ou *Rabconnectine-3* jouait un rôle important dans la régulation de la voie Notch et la formation des follicules ovariens chez la drosophile (Sethi et al., 2010; Yan et al., 2009). Le Sanger Institute venait de mettre en place une lignée de souris que nous avons pu acquérir permettant de réaliser un KO total ou conditionnel du gène *Dmxl2* [*Dmxl2tm1a(EUCOMM)Wtsi*]. Le phénotype de ces souris a été étudié dès la fin de doctorat de Maëva, puis lors des stages de master de Clara Gobé et de sa thèse. En étudiant *DMXL2* (cible potentielle de FOXL2), notre objectif initial était de nous intéresser à la différenciation des cellules somatiques de l'ovaire fœtal, mais, au fur et à mesure de nos avancées, *DMXL2* nous a étonnamment amené à nous intéresser aux cellules germinales du testicule adulte...

Dans un premier temps, nous avons réalisé le KO total de *Dmxl2* chez la souris, qui s'est avéré léthal dans les 12h suivant la naissance. Les souriceaux *Dmxl2*<sup>-/-</sup> ne se nourrissent pas (estomac vide de lait) et certains présentent des hypoglycémies sévères (les mâles uniquement). La cause exacte du décès des nouveau-nés n'a pas pu être établie, mais des anomalies métaboliques et neurologiques globales sont suspectées. La localisation de l'expression de *Dmxl2* au niveau cérébral, montre en effet que plusieurs régions du cerveau sont susceptibles d'être touchées (cortex cérébral, bulbe olfactif...). En collaboration avec l'unité de NeuroBiologie de l'Olfaction (NBO, INRA, Jouy-en-Josas), nous avons d'ailleurs démontré que *DMXL2* était impliqué dans la transmission de l'information neuronale entre la muqueuse et le bulbe olfactif.

Dans les gonades, il s'est avéré que *DMXL2* était exprimé par les cellules de soutien et les cellules germinales au cours de la folliculogénèse chez les femelles ou de la spermatogénèse chez les mâles. Des KO conditionnels pour l'un, l'autre ou les deux types cellulaires ont été obtenus par croisements avec des lignées de souris

exprimant une Cre recombinase spécifiquement dans l'un de ces types cellulaires (*Amhr2-Cre* pour les cellules de granulosa, *Amh-Cre* pour les cellules de Sertoli, *Ddx4-Cre* pour les cellules germinales). Il s'est alors avéré que DMXL2 jouait principalement un rôle dans les cellules germinales du testicule lors de la première vague de spermatogénèse (7 semaines post-partum). En effet, l'absence de son expression dans les cellules germinales mâles affecte leur différenciation (augmentation de l'apoptose). L'activité phagocytaire des cellules de Sertoli augmente alors pour permettre l'élimination des spermatozytes/spermatides anormaux, induisant une concentration plus faible de spermatozoïdes dans l'épididyme (diminution de 60%). Une normalisation du nombre de spermatozoïdes est néanmoins observée à des stades ultérieurs et la fertilité des adultes n'est pas affectée, indiquant que les fonctions de DMXL2 sont essentiellement limitées à la première vague de spermatogénèse ou que des processus compensatoires se produisent après la puberté.

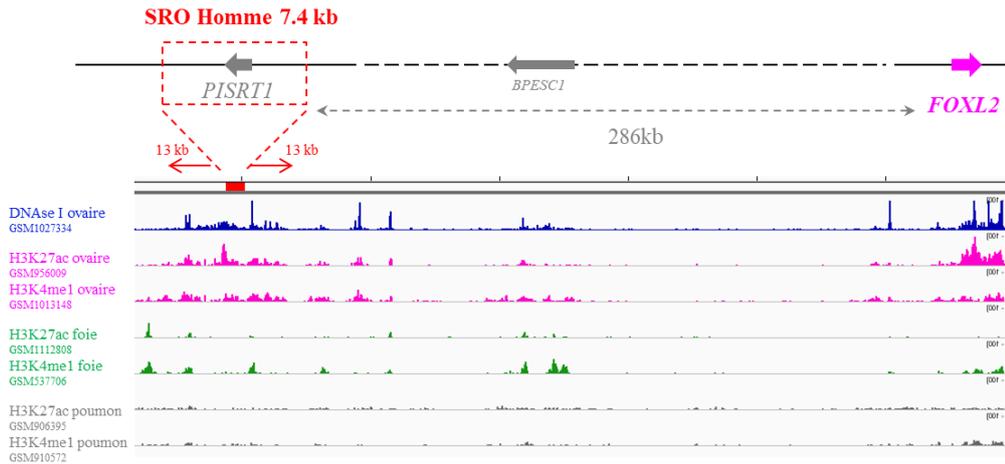
Au cours de l'évolution, la souris a optimisé sa fonction de reproduction. La mise en place de la spermatogénèse murine doit être rapide et efficace. Il est fortement supposé qu'elle nécessite des mécanismes génétiques particuliers, voire spécifique de la souris, comme c'est le cas par exemple pour le gène *Rhox 13* qui n'existe que chez les rongeurs (Busada et al., 2016). Tout comme *Dmxl2*, *Rhox13* est impliqué dans la première vague de spermatogénèse et son invalidation conduit à un phénotype similaire dans le testicule. L'expression de ces gènes dans les cellules germinales mâles pourrait constituer un avantage chez la souris, soutenant la fertilité précoce, en fournissant des cellules germinales supplémentaires au début de la vie reproductive de l'animal.

En parallèle de ce travail couronné par une publication dans PLoS Genetics en 2019, Clara s'est aussi intéressée de plus près à *Foxl2* chez la souris et à la régulation de son expression. En effet, les différents KO conditionnels à mettre en place pour l'étude de *Dmxl2* généraient un temps de latence important avant l'obtention des animaux définitifs et leur analyse. Ce temps a été mis à profit pour développer une preuve de concept dans l'équipe : l'édition de l'épigénome (Crédit Incitatif du département PHASE : EDITO, EDITing de l'épigénome Ovarien)

### 3.2. Régulation de l'expression de *Foxl2* chez la souris : aspect épigénétique.

Un autre volet a donc été ajouté à la thèse de Clara afin de développer ses connaissances sur la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Le locus *Foxl2/FOXL2* constituait un objet d'étude idéal. La mutation PIS chez la chèvre, ainsi que les mutations responsables d'un BPES répertoriées chez l'homme (délétions/translocations) pointent une petite région du génome autour du gène *PISRT1* de 7,4 kb (il s'agit de la plus petite délétion commune aux patients BPES ou Smallest Region of Overlap ou SRO)(D'haene et al., 2009). D'après les données disponibles dans ENCODE, des marques d'histones caractéristiques d'enhancers

actifs (H3K27ac et H3K4me1) sont observées dans l’ovaire humain autour de cette région (**figure 14**).



**Figure 14 . Etat épigénétique du locus *FOXL2* chez l’Homme.**

Les données proviennent du site ENCODE (<https://www.encodeproject.org/>) et sont visualisées grâce au navigateur de génome IGV. La première piste montre les données de DNase-seq obtenues à partir d’ovaire (en bleu). Elle permet de visualiser les régions chromatiniennes ouvertes et donc potentiellement actives. Les pistes suivantes correspondent à des données de CHIP-seq pour H3K4me1 (promoteurs et enhanceurs « primés ») et H3K27ac (promoteurs et enhanceurs actifs). Dans l’ovaire (en rose), on observe un enrichissement des marques épigénétiques H3K27ac et H3K4me1 autour du gène *FOXL2*, ainsi qu’au niveau et de part et d’autre de la région SRO (au total ~30 kb). *A contrario*, dans le foie (en vert) et le poumon (en gris), ces deux marques ne semblent pas/peu enrichies.

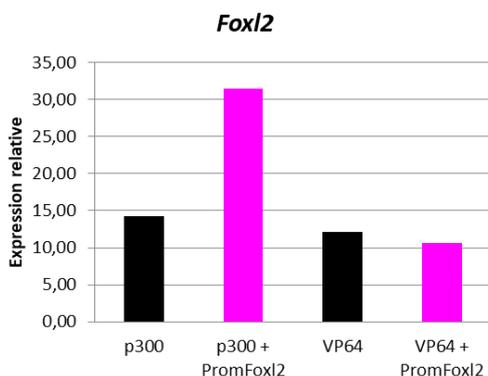
Clara s’est intéressée à l’équivalent de cette région SRO dans le génome de la souris (environ 6kb) qui présente plusieurs éléments très conservés à travers l’évolution. Certains sont conservés jusqu’aux Tétrapodes (Tetra), aux amniotes (Amnio), aux mammifères (Mam) ou jusqu’aux placentaires uniquement (Pla) (**figure 15A**). De façon similaire à ce qui a été observé chez l’humain, Clara montre qu’un enrichissement en H3K27ac est retrouvée autour de cette région dans l’ovaire, ainsi qu’autour du gène *Foxl2* (ChIP-qPCR, **figure 15B**).



**Figure 15. Etat épigénétique du locus *Foxl2* chez la souris. A. Représentation schématique des éléments conservés à travers l’évolution au sein de l’équivalent de la région SRO chez la souris. B. Analyse de l’enrichissement en H3K27ac et H3K27me3. H3K27ac est observé dans l’ovaire au niveau de la région SRO et du promoteur/gène *Foxl2*. H3K27me3 (chromatine réprimée) est enrichi au niveau du promoteur/gène *Foxl2* dans le testicule ou le foie. Le gène *Mybpc* (exprimé dans le myocarde) constitue un contrôle, au moins pour le ChIP H3K27ac. Le bruit de fond, évalué par un anti-IgG, est retranché à la valeur d’immunoprécipitation obtenue pour l’anticorps d’intérêt. PromF = promoteur de *Foxl2* ; PromP = promoteur de *Pisrt1*. Nombre de ChIP indépendants pour H3K27ac : Ovaire n=5, Testicule n=5, Foie n = 4 ; pour H3K27me3 : Ovaire et Testicule n = 1,**

Foie n =2.  
Données non publiées.

Si cette région distale correspond à un /des enhancer(s) de *Foxl2*, des modifications de son état épigénétique devraient impacter son expression. A l'époque, « l'épigénome editing » commençait à se développer grâce à la technologie CRISPR/dCas9 (deleted Cas9). En couplant la dCas9 inactive avec différentes sous unités ou protéines il était devenu possible de modifier à volonté l'épigénome d'un locus précis dans le but d'exprimer ou d'inhiber un gène. En particulier il est possible d'hyper-acétyler des promoteurs ou des enhancers *in vitro* et de stimuler l'expression de gènes situés à distance (utilisation d'une dCas9-p300) (Hilton et al., 2015). Dans le cadre d'un projet pilote financé par notre département de recherche, Clara s'est impliquée dans la mise au point de l'épigénome editing *in vitro*. L'objectif final aurait été de modifier l'acétylation de la région SRO pour prouver son implication dans la régulation de *Foxl2*, mais dans le temps imparti, Clara s'est surtout attachée à réaliser une preuve de concept en se concentrant sur le promoteur de *Foxl2*. L'une des difficultés majeures a été de trouver une lignée cellulaire adéquate : transfectable de façon efficace et exprimant *Foxl2* (mais pas trop) afin que son promoteur puisse être accessible (absence de méthylation de l'ADN ou de H3K27me3). La meilleure solution a été de travailler avec la lignée murine  $\alpha$ -T3 dérivée de cellules gonadotropes hypophysaires. Selon le même procédé que Hilton et al. (2015), quatre ARN guides ciblant une région de moins de 300 pb de part et d'autre du site d'initiation de la transcription de *Foxl2* ont été désignés (<http://crispor.tefor.net/>) et générés (3 en amont et 1 en aval). En ciblant le promoteur de *Foxl2* avec ces 4 ARN guides et en surexprimant une dCas9-p300 dans des cellules  $\alpha$ -T3, Clara a pu montrer qu'il était possible d'augmenter l'expression de *Foxl2* en induisant l'hyper-acétylation de son promoteur *in vitro* (résultats préliminaires, **figure 16**). Cette preuve de concept, bien qu'encourageante, n'a pas été poursuivie, la thèse de Clara arrivant à sa fin.



**Figure 16. Induction de l'expression de *Foxl2* après transfection de dCas9-p300 et d'ARN guides ciblant son promoteur dans des cellules  $\alpha$ -T3.** Après transfection, les cellules  $\alpha$ -T3 ayant reçu les différents vecteurs d'expression ont été maintenues en culture pendant 3 semaines sous sélection (résistance à la Généticine). Les niveaux d'expression de *Foxl2* ont été mesurés par RT-qPCR et ont été rapportés au gène de ménage *Sdha*. En présence de dCas9-p300 et des ARN guides ciblant son promoteur, l'expression de *Foxl2* est doublée. Aucun effet n'est obtenu avec une dCas9-VP64 (dCas9 fusionnée avec le domaine transactivateur du virus de l'herpes simplex), mais ces résultats semblent logiques. Il s'agit en effet d'un activateur CRISPR de première génération, dont l'effet est généralement plus faible que ce qui peut être observé avec p300 (Hilton et al., 2015). Données non publiées.

Ces dernières années, l'intérêt croissant pour cette technologie, notamment dans le domaine médical (Rahman and Tollefsbol, 2021; Syding et al., 2020) ou en agronomie (chez les plantes) (Fal et al., 2021; Selma and Orzáez, 2021), a permis le développement d'une nouvelle génération d'outils programmables de l'édition de l'épigénome. Ces « Epigenomic memory writers » de précision induisent moins de off-target et permettent de réprimer (CRISPRi) ou d'activer/réactiver (CRISPRa) de façon stable et héritable l'expression des gènes (Gjaltema and Rots, 2020; Nuñez et al., 2021). A l'heure où des organoïdes de gonades se développent à partir de cellules souches embryonnaires chez la souris (génération de follicules ovariens (Yoshino et al.,

2021)) ou à partir de cellules pluripotentes induites chez l'humain (différenciation de gonades bipotentielles (Knarston et al., 2020)), ces outils pourraient être particulièrement utiles chez les animaux d'élevage pour reprogrammer l'épigénome de cellules souches et créer de nouveaux modèles d'étude *in vitro*.

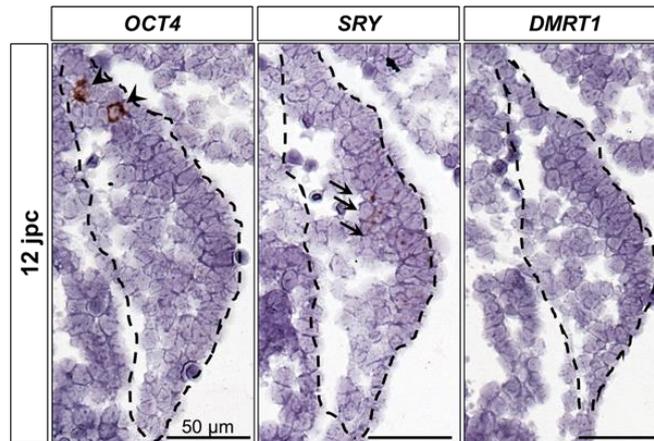
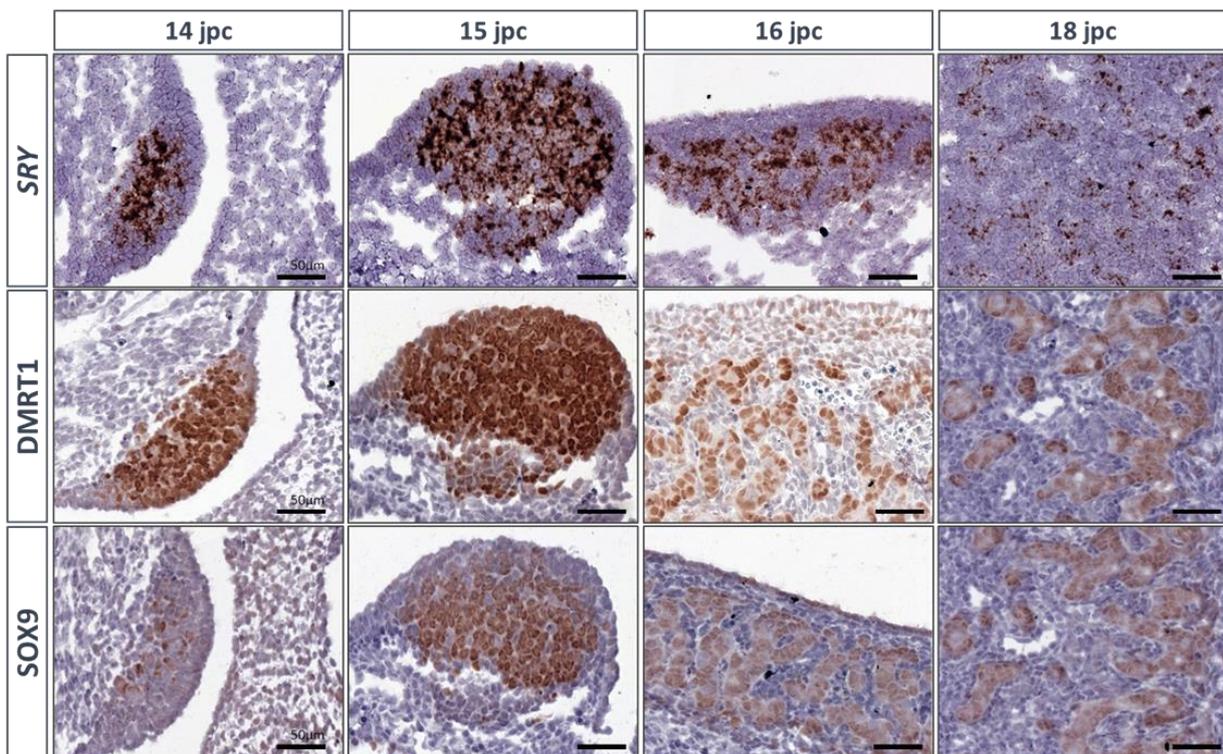
Alors que l'édition de l'épigénome à pour le moment été mise de côté dans l'équipe, l'édition du génome par CRISPR/Cas9 s'est au contraire bien développée chez les ruminants (chèvre, mouton) et chez le lapin, dans le but d'ajuster la compréhension du rôle des gènes chez des espèces non murines. A la fin de la [thèse de Maëva Elzaïat](#) (2015), Geneviève Jolivet avait entrepris de réaliser l'invalidation de *DMRT1* chez le lapin, afin de tester l'hypothèse selon laquelle il pourrait jouer un rôle déterminant dans l'expression du gène *SOX9* et l'activation de la cascade génétique mâle. Grâce à sa persévérance et sa patience, une lignée de lapin génétiquement modifiée pour *DMRT1* a été établie, et l'étude du phénotype des gonades mutantes fait actuellement l'objet principal de la [thèse d'Emilie Dujardin](#) débutée en Octobre 2020.

#### 4. Rôle de *DMRT1* dans la détermination du sexe et le maintien de la fertilité chez les mâles : Analyse du phénotype de lapin *DMRT1* KO. Thèse d'Emilie Dujardin, 2020 - ... Financements ANR RNA-sex (2020 – 2024), API et demi-bourse de thèse du département PHASE

##### 4.1. *DMRT1*, détermination du sexe et différenciation des gonades

Dans un premier temps, Emilie Dujardin s'est attachée à étudier et à décrire la détermination et la différenciation gonadique chez le lapin en suivant la cinétique d'expression de différents marqueurs. Chez le mâle, Emilie montre notamment que les expressions de *SRY*, *DMRT1* et *SOX9* sont séquentielles (**figure 17**). L'expression de *SRY* débute ainsi dès 12 jpc, au niveau de cellules du mésenchyme sous-jacent à l'épithélium de surface (**figure 17A**) puis s'étend à l'ensemble des cellules somatiques en dehors de l'épithélium coelomique (14 et 15 jpc, **figure 17B**) (voir ANNEXE 1 p96 pour une chronologie comparée de la différenciation gonadique souris, chèvre, lapin). L'expression de *DMRT1* est ensuite détectée à partir de 13 jpc (données d'hybridation *in situ* non montrées) dans toutes les cellules somatiques de la gonade, y compris au niveau de l'épithélium de surface (**figure 17B**). A partir de 14 jpc, l'expression de *SOX9* peut être détectée dans quelques cellules au cœur de la gonade XY, puis s'étend à tout le mésenchyme sous cortical (15 jpc) avant d'être restreinte aux cordons testiculaires à 16 jpc, tout comme *SRY* et *DMRT1*.

Ainsi, d'après les résultats obtenus par Emilie, il apparaît que les cellules qui activent l'expression de *SOX9* dans la gonade XY sont des cellules qui expriment à la fois *SRY* et *DMRT1*. A partir de 16 jpc, les cellules de Sertoli sont « spécifiées ». L'expression de *SRY* diminue et *SOX9* et *DMRT1* restent exprimés dans les cellules de Sertoli.

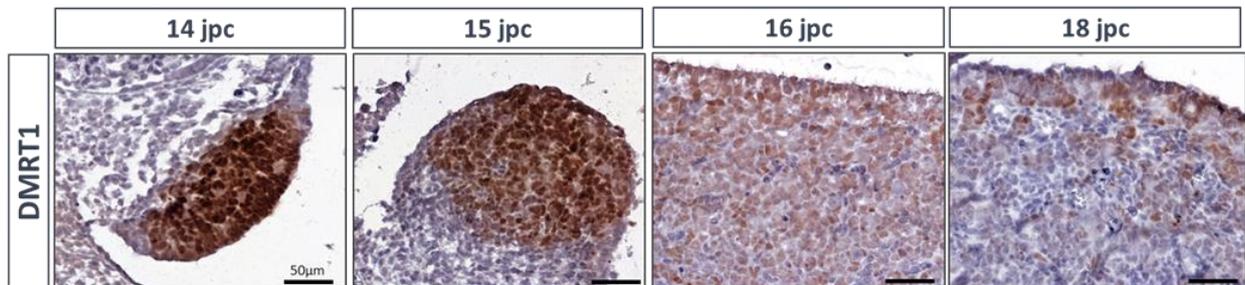
**A****B**

**Figure 17. Dynamique d'expression des marqueurs de la différenciation testiculaire. A. Expression de *OCT4*, *SRY* et *DMRT1* à 12jpc.** Détection par hybridation *in situ* (RNAscope). Les crêtes génitales se forment entre 11 et 12 jpc. Les cellules germinales sont encore en cours de migration. Quelques-unes ont atteint la gonade comme en atteste le marquage *OCT4* (tête de flèche). Un faible signal est observé pour *SRY* (flèches). Aucun marquage n'est observé pour *DMRT1*. **B. Expression de *SRY*, *DMRT1* et *SOX9* au cours de la différenciation du testicule entre 14 et 18 jpc.** L'expression de *SRY* est détectée par hybridation *in situ* (RNAscope), ; celles de *DMRT1* et *SOX9* par immunohistochimie. A 14 jpc puis 15 jpc, *SRY* est exprimé par les cellules du mésenchyme sous l'épithélium de surface. A ces stades, *DMRT1* est détecté dans toutes les cellules de la gonade (épithélium et mésenchyme). L'expression de *SOX9* débute à 14 jpc, dans quelques cellules localisées au cœur de la gonade, puis s'étend à tout le mésenchyme sous cortical. A 16 jpc, *SRY*, *DMRT1* et *SOX9* sont détectés dans les cordons séminifères en formation. A partir de 18 jpc, l'expression de *SRY* diminue dans les cordons. Barres d'échelle = 50 μm.

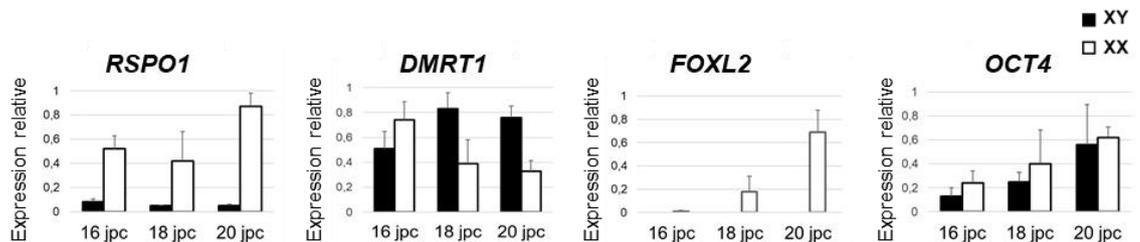
Dans les gonades XX, l'expression de *DMRT1* est aussi activée de façon similaire à ce qui peut être observé chez les XY (dès 13 jpc, données d'hybridation *in situ*, non montrées). A 14 jpc, la protéine *DMRT1* est détectée dans l'ensemble des cellules somatiques du futur ovaire. A 16 jpc, alors que la différenciation ovarienne s'initie, comme en témoigne l'augmentation spécifique de l'expression de *RSPO1* dans la gonade XX (**figure 18B**), l'expression de *DMRT1* est maintenue dans les cellules somatiques (**figure 18 A et B**). Néanmoins à

partir de 18 jpc, alors que l'expression de *FOXL2* est initiée dans des cellules localisées au cœur de la gonade, l'expression de *DMRT1* commence à diminuer. Celle-ci se restreint ensuite progressivement à l'épithélium de surface de l'ovaire (OSE : Ovarian Surface Epithelium) où quelques cellules sont encore positives à 20 jpc, puis disparaît des cellules somatiques (**figure 18 A, B, C**).

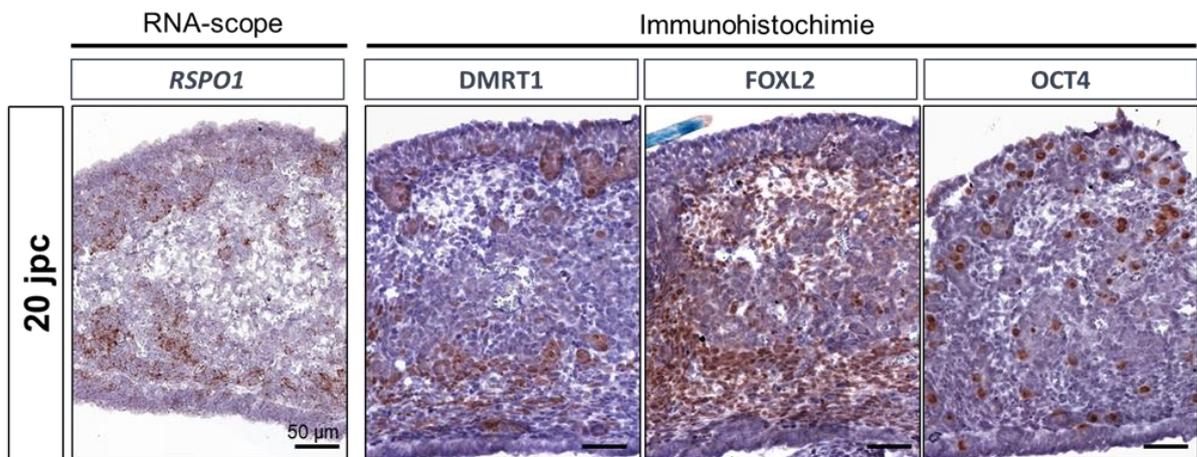
**A**



**B**



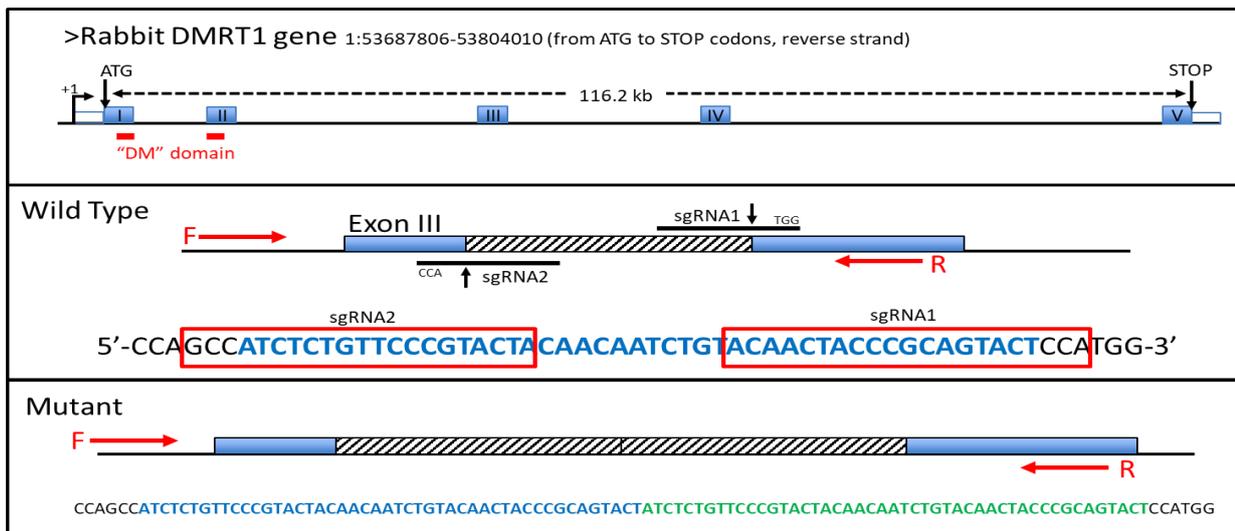
**C**



**Figure 18.** Différenciation de l'ovaire fœtal de lapin. **A.** Immunodétection de *DMRT1* dans la gonade XX entre 14 et 18 jpc. Toutes les cellules de la gonade en formation sont marquées pour *DMRT1* jusqu'à 16 jpc. A 18jpc l'expression de *DMRT1* commence à se restreindre à l'OSE. **B.** Dynamique d'expression de *RSP01*, *DMRT1*, *FOXL2* et *OCT4* entre 16 et 20 jpc. A ces stades les gonades ont été disséquées des mésonéphros. La différenciation ovarienne est marquée dès 16 jpc par l'expression sexuellement dimorphique de *RSP01*. L'expression de *FOXL2* ne débute qu'à partir de 18 jpc. Les niveaux d'expression ont été analysés par RT-qPCR ; les résultats sont exprimés par rapport à 3 gènes de référence Splicing Factor 1, *H2AFX* et *HPRT1* (software Qbase). **C.** Localisation de l'expression de *RSP01*, *DMRT1*, *FOXL2* et *OCT4* à 20 jpc dans l'ovaire. L'expression de *RSP01* est détectée par hybridation *in situ* alors que celle de *DMRT1*, *FOXL2* et *OCT4* est détectée par immunohistochimie.

#### 4.2. Effets du Knock-out de *DMRT1* sur la différenciation gonadique.

Depuis 2015, plusieurs essais d'inactivation du gène *DMRT1* chez le lapin avaient été réalisés à l'aide de TALEN (Transcription activator-like effector nuclease). C'est finalement l'avènement de la technologie CRISPR/Cas9, qui nous a permis d'obtenir et d'établir une lignée de lapins mutante pour *DMRT1* (**figure 19**).



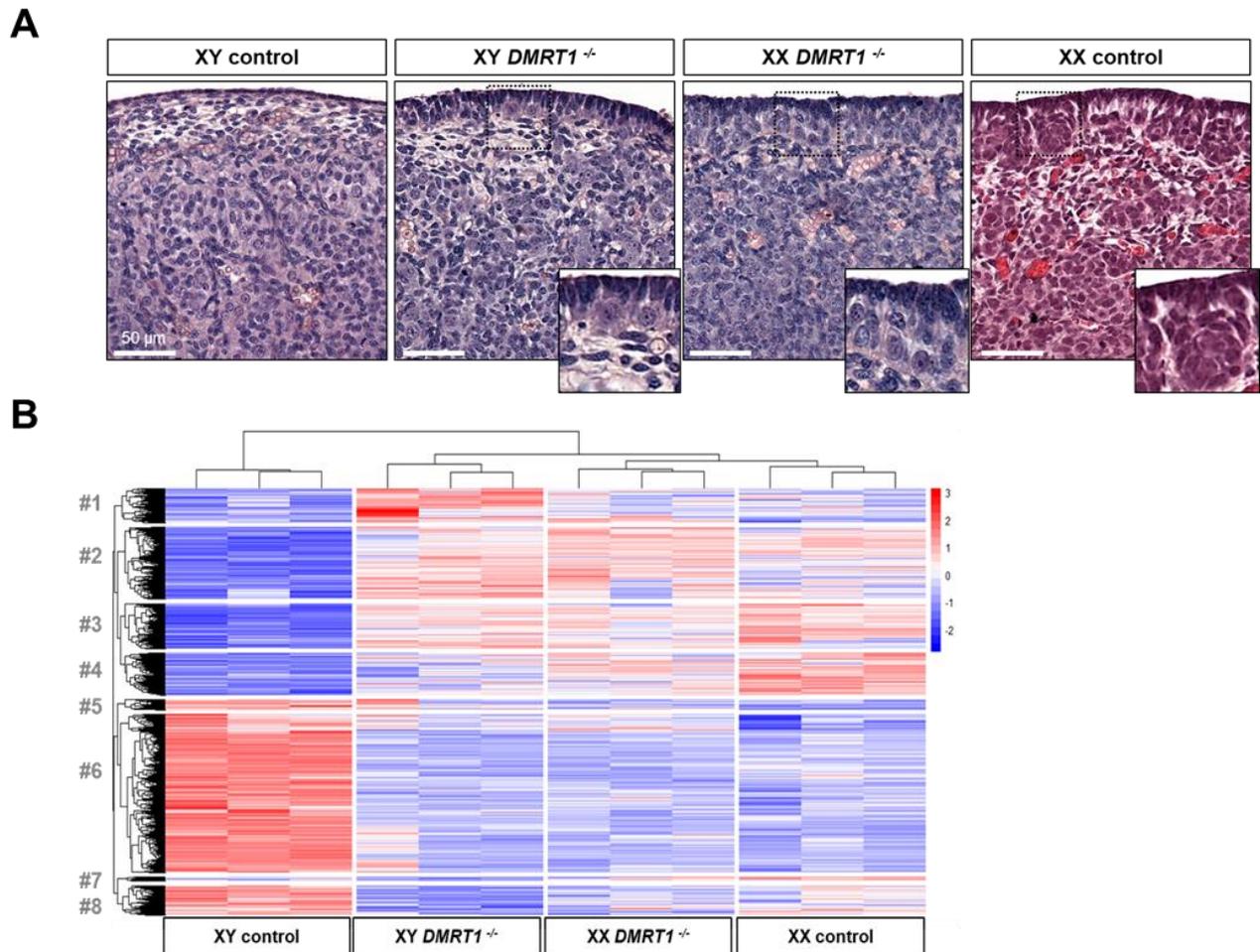
**Figure 19. Structure du gène *DMRT1* et stratégie CRISPR/Cas9 chez le lapin.** Le gène *DMRT1* s'étend sur 116.2kb du chromosome 1 de lapin (+1: site d'initiation de la transcription; ATG: site d'initiation de la traduction; STOP: codon stop). Les exons traduits sont représentés par des rectangles bleus numérotés. Les rectangles blancs représentent la 5'- et la 3'-UTR. Le domaine de liaison à l'ADN (DM domain, souligné en rouge) s'étend sur les exons I et II. Le troisième exon (exon III) a été ciblé par le système CRISPR/Cas9 pour induire des mutations. La position des deux guides (sgRNA1 and sgRNA2) est indiquée par les barres noires horizontales, ainsi que la séquence PAM (NGG) et la position de la coupure induite par la Cas9 (flèche noire verticale). La séquence nucléotidique est indiquée dessous (séquence des sgRNAs encadrée en rouge). La boîte hachurée et les lettres bleues en gras pointent la séquence entre les points de clivage théoriques et attendus. Dans l'allèle mutant, le fragment clivé a été inséré en tandem au site de clivage. Ainsi, par séquençage, une répétition a été trouvée (répétitions écrites en bleu et vert, sur le panel du bas). Cette insertion crée un décalage du cadre de lecture et induit l'apparition d'un codon stop prématuré. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de DMRT1 montre qu'aucune protéine mutante n'est produite (western-blot et immunohistochimie, données non montrées).

Les croisements réalisés entre lapins hétérozygotes *DMRT1*<sup>+/-</sup> produisent une descendance *DMRT1*<sup>-/-</sup> stérile, aussi bien chez les XY que chez les XX. Pour comprendre le rôle de DMRT1 lors de la détermination/différenciation gonadique dans les deux sexes, Emilie a engagé des analyses histologiques et moléculaires au stade fœtal de 20 jpc. A ce stade chez les fœtus contrôles, le testicule et l'ovaire se sont chacun engagés dans leur processus de différenciation.

- **DMRT1 : un facteur déterminant du testicule chez le lapin**

Pour les XY *DMRT1*<sup>-/-</sup>, les études histologiques montrent une inversion sexuelle précoce des fœtus qui commencent à développer des ovaires à la place de testicules (**figure 20A**). Un épithélium de surface de type « OSE » se développe au niveau cortical, ainsi que des cordons de types ovigères dans la medulla. Les analyses transcriptomique haut débit réalisées au même stade (RNAseq) montrent clairement que les gonades XY *DMRT1*<sup>-/-</sup> sont très proches des ovaires contrôles et *DMRT1*<sup>-/-</sup>, même si des spécificités peuvent être observées (**figure 20B**). L'expression de marqueurs typiques des cellules ovariennes est ainsi augmentée chez les XY *DMRT1*<sup>-/-</sup> (*FOXL2*, *CYP19A1*, *RSPO1*, *LGR5*, *RUNX1*...) ainsi que celle de nombreux marqueurs associés aux cellules germinales (*PRDM14*, *LIN28A*, *TFAP2C*, *OCT4*, *DDX4*).

Ces résultats révèlent qu'en absence de *DMRT1* dans les gonades XY, les cellules somatiques et germinales ont adopté un « destin femelle ».



**Figure 20.** Effets de l'inactivation de *DMRT1* dans des gonades de lapins à 20 jpc. **A.** Analyse histologique par coloration Hématoxyline/Eosine. Les gonades XY *DMRT1*<sup>-/-</sup> présentent une morphogénèse de type ovarienne. **B.** Représentation sous forme de heat map des niveaux d'expression des transcrits gonadiques en fonction des génotypes XY/XX, contrôles et *DMRT1*<sup>-/-</sup>. Les analyses DESeq2 de différentes conditions 2 à 2 (XY contrôles vs XY KO ; XX contrôles vs XX KO ; XY KO vs XX KO et XY contrôles vs XX contrôles) font apparaître 3461 gènes différentiellement exprimés dans au moins une des conditions ( $1 < \text{Log}_2 \text{FC}$  ou  $\text{Log}_2 \text{FC} < -1$  et pValue ajustée  $< 0,05$ ). Les niveaux d'expression de ces gènes, regroupés en cluster par une analyse hiérarchique, sont présentés sous forme de heat map. Ces regroupements font apparaître 8 clusters présentant des profils particuliers. Le contenu génique de ces clusters est en cours d'analyse par Emilie. FC : Fold Change.

L'expression du gène *SOX9* est au contraire effondrée.

Les analyses immunohistochimiques réalisées révèlent que quelques cellules tendent à exprimer la protéine *SOX9*, mais aucune de ses cibles connues n'est activée (ex : *AMH*, *DHH*...) (**figure 21A et B**). Ainsi en absence de *DMRT1*, *SOX9* ne peut activer la cascade génétique mâle dans la gonade XY. Deux mécanismes complémentaires sont suspectés : (i) sans *DMRT1*, *SRY* ne peut pas activer l'expression de *SOX9* à un niveau suffisant pour induire la masculinisation et (ii) sans *DMRT1*, *SOX9* ne peut activer l'expression de ses gènes cibles. Ces deux aspects sont à relier avec l'hypothèse d'un rôle de facteur pionnier pour *DMRT1* postulé par le laboratoire de David Zarkower et discuté plus loin dans ce manuscrit (voir page 57 (Lindeman et al., 2021)).

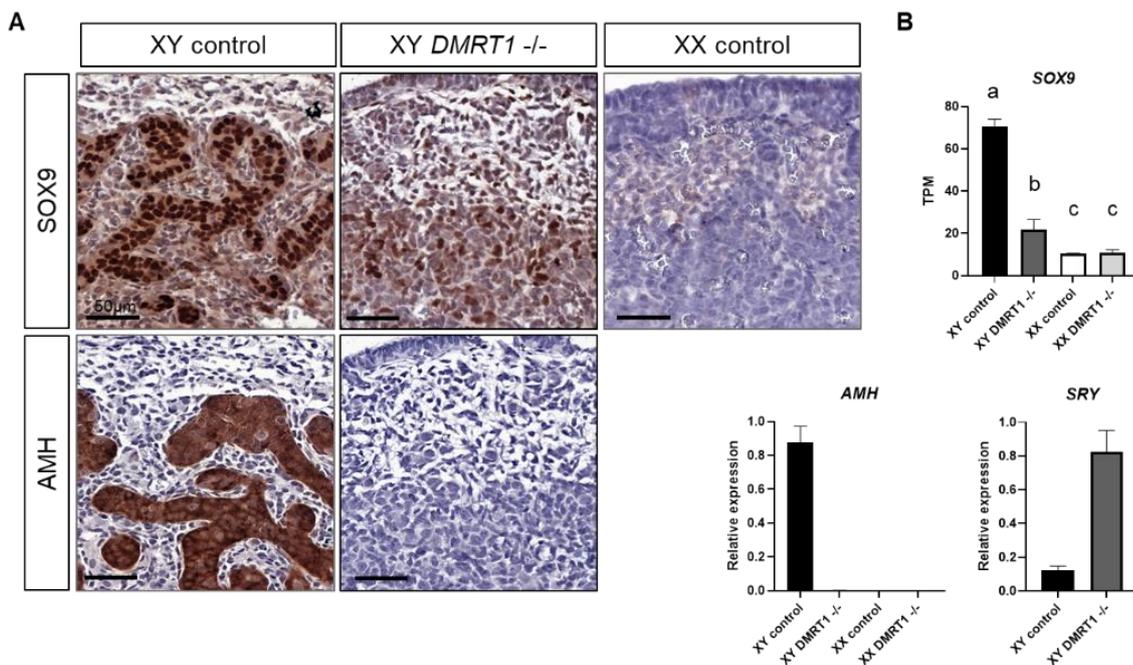


Figure 21. Expression de SOX9, AMH et SRY à 20 jpc. A. Immunodétection de SOX9 et de l'AMH dans des gonades XY contrôles ou *DMRT1*<sup>-/-</sup>. Ces deux facteurs sont observés dans les cellules de Sertoli organisées en cordons séminifères. Dans la gonade XY *DMRT1*<sup>-/-</sup>, quelques cellules dispersées sont positives pour SOX9. Dans la gonade XX control, un léger marquage cytoplasmique est observé dans le mésenchyme sous-jacent à l'OSE. B. Niveau d'expression de SOX9 (données de RNAseq), AMH et SRY (RT-qPCR) dans les gonades XX et XY, contrôles et *DMRT1*<sup>-/-</sup>. Pour SOX9 : TPM, Transcripts Per Million. Pour AMH et SRY, l'expression relative est normalisée par 3 gènes de références. Les lettres font apparaitre les différences statistiquement significatives entre conditions (pValue ajustée <0.05).

L'expression de *SRY* au contraire est maintenue à un niveau élevé dans les gonades XY *DMRT1*<sup>-/-</sup> (figure 21B) ce qui i) confirme que c'est normalement SOX9 dans un testicule qui est responsable de la diminution d'expression de *SRY* (tel que décrit chez la souris) et ii) peut laisser supposer que sans *DMRT1*, *SRY* est incapable d'agir et de pallier à l'absence de SOX9 pour promouvoir la différenciation testiculaire.

**L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure et de valider notre hypothèse de départ :**

**Le gène *DMRT1* est impliqué dans la détermination testiculaire chez le lapin.**

***DMRT1* est indispensable pour l'expression du gène *SOX9* au même titre que *SRY*.**

Chez la souris, plusieurs enhanceurs distaux régulent l'expression du gène *Sox9* en fonction des tissus et des stades de développement (32 enhanceurs décrits) (Gonen et al., 2018). Dans le testicule en particulier, il a été montré que *SRY* peut activer l'expression de *Sox9* en se fixant sur « l'Enhancer 13 » (pour rappel, voir figure 2 page 27). La région correspondant à cet enhanceur apparaît être conservée à travers l'évolution chez les mammifères. Un à deux sites de fixation pour *SRY* peuvent y être observés. Curieusement, l'ensemble des mammifères étudiés, sauf la souris et le rat, présente, en plus, un à plusieurs sites de fixation pour *DMRT1* sur cette région (figure 22). Pour démontrer le lien direct entre *DMRT1* et *SOX9* chez le lapin, Emilie réalise actuellement des ChIP avec un anticorps anti-*DMRT1*, en ciblant prioritairement l'analyse de la région de l'enhancer 13.

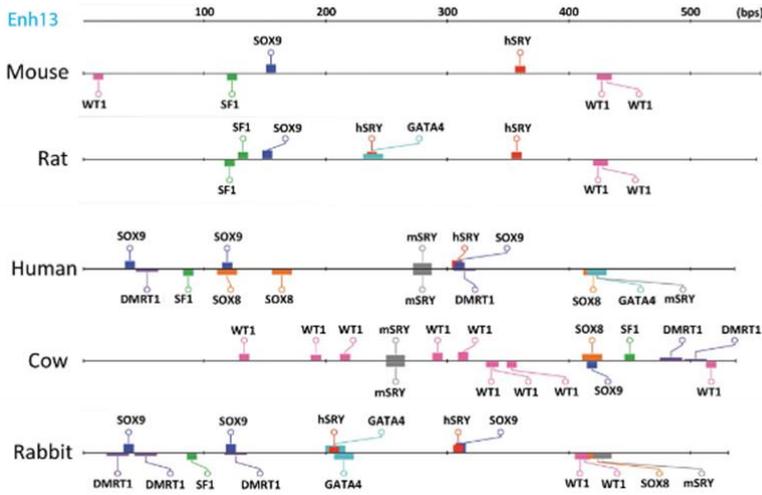


Figure 22. Localisation de sites de fixation de facteurs de transcription au niveau de l'Enhancer 13 de *SOX9* chez les mammifères. Les sites de fixation potentiels pour les principaux acteurs de la détermination du sexe ont été recherchés chez différentes espèces de mammifères. La souris ou le rat ne possède pas de site pour *DMRT1*, alors qu'un à plusieurs sites sont identifiés chez l'homme, le bovin ou le lapin (présentés ici), mais aussi chez le porc, le chien, le dauphin, l'orang-outan et le chimpanzé (voir la figure supplémentaire S3 de la publication de Gonen et al., 2018).

- **DMRT1 et différenciation précoce de l'ovaire**

Les analyses histologiques réalisées au stade fœtal de 20 jpc ne montrent pas de différences notables entre un ovaire *DMRT1*<sup>-/-</sup> et un ovaire contrôle. Néanmoins, les données transcriptomiques obtenues font état de 416 gènes dont l'expression est dérégulée en absence de *DMRT1* dans l'ovaire : 223 up et 193 down régulés (analyses DESeq2, pValue ajustée <0.05) (figure 23B). Parmi les termes enrichis (analyses XGR), on trouve la voie de signalisation WNT avec une douzaine de gènes qui y sont associés (figure 23A). En particulier, l'expression de *DKK1* (régulateur négatif de la voie WNT) est augmentée, alors que celle de *RSPO1* (régulateur positif) est diminuée (figure 23C). En accord avec un rôle potentiel de *DMRT1* sur la transcription du gène *RSPO1*, l'étude de leur expression dans un ovaire de 20 jpc montre une localisation similaire (figure 18C).

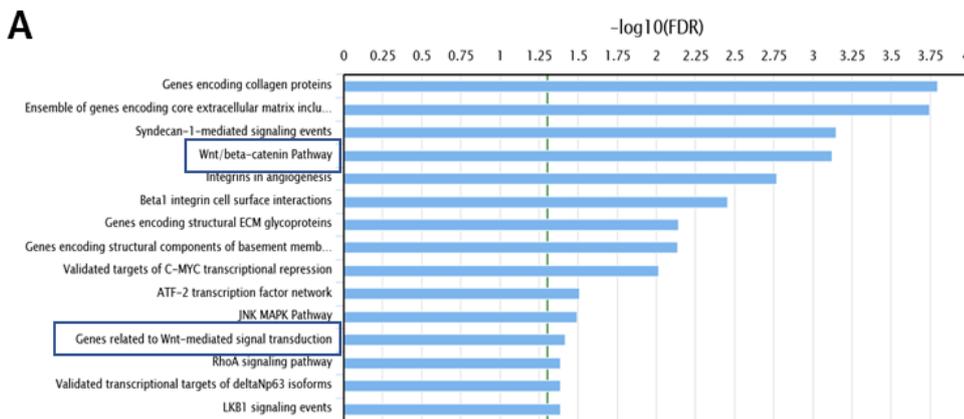
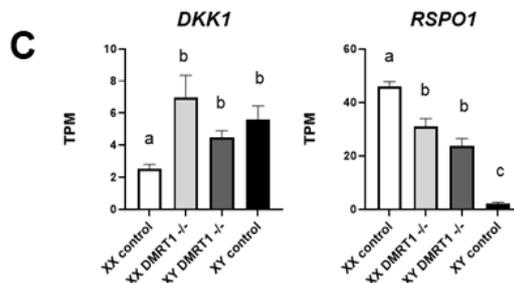
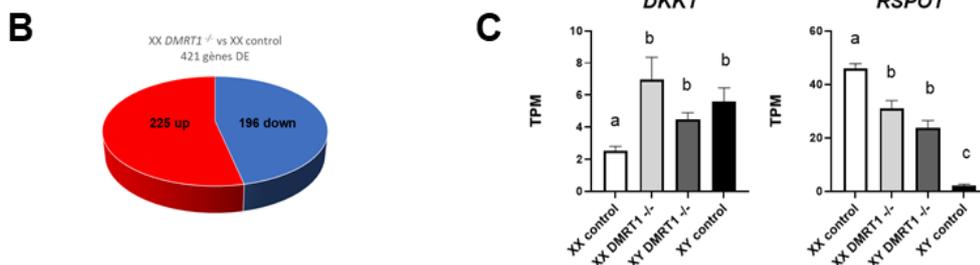


Figure 23. Analyse transcriptomique de l'effet de l'inactivation de *DMRT1* dans la gonade XX à 20 jpc. A. Analyse des voies ou termes enrichis parmi les gènes dérégulés chez les XX *DMRT1*<sup>-/-</sup>. Analyse réalisée grâce au logiciel XGR (eXploring Genomic Relations for enhanced interpretation). B. Représentation schématique du nombre de gènes up-régulés et down-régulés chez les XX *DMRT1*<sup>-/-</sup>. Analyse DESeq2, pValue ajustée <0.05. C. Niveau d'expression de *DKK1* et *RSPO1* dans les gonades XX et XY, contrôles et *DMRT1*<sup>-/-</sup>. TPM : Transcripts Per Million. Les lettres font apparaitre les différences statistiquement significatives entre conditions.



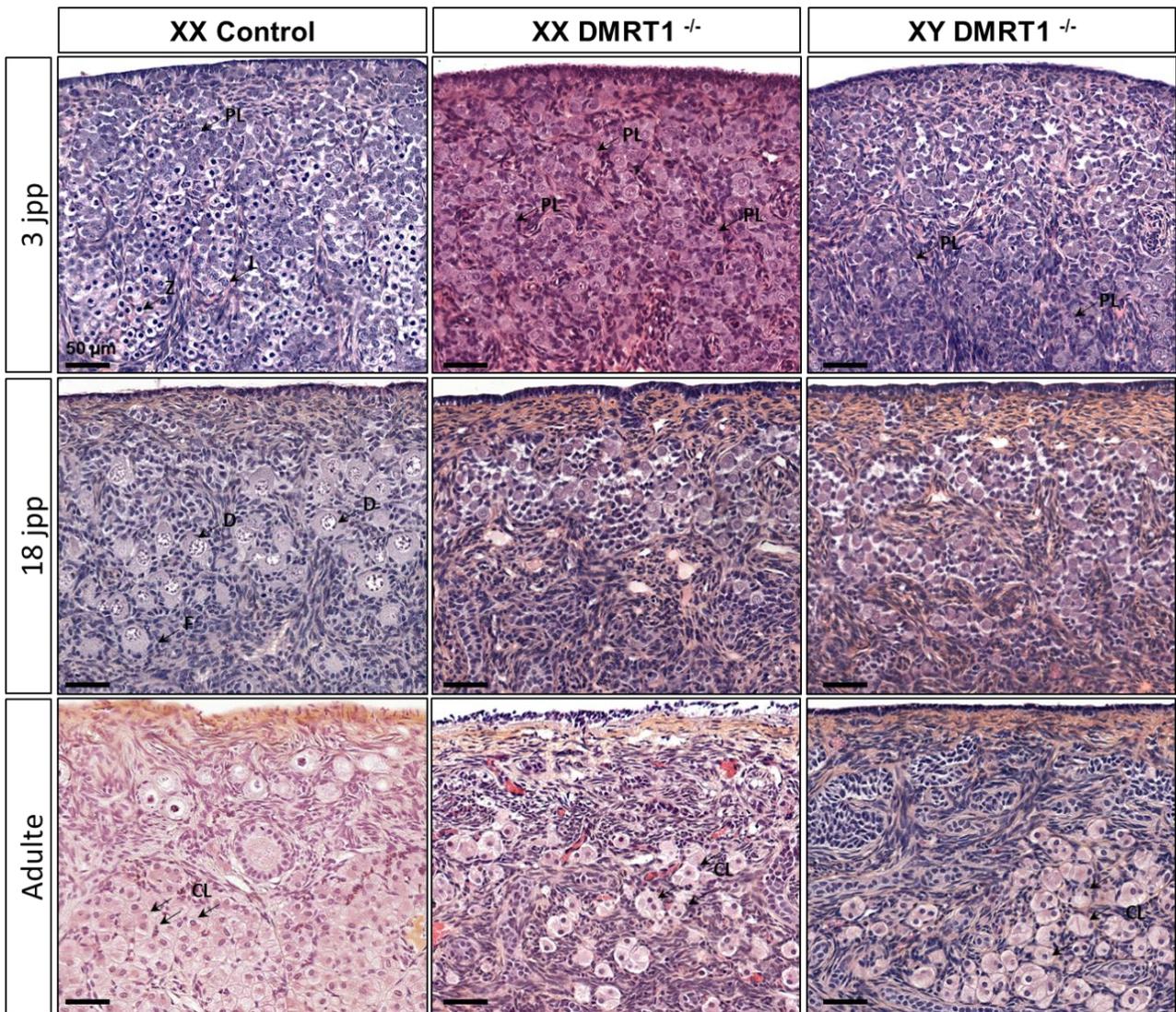
L'étude de stades plus avancés de la différenciation ovarienne chez les XX *DMRT1*<sup>-/-</sup> montre un maintien anormalement long de l'expression de OCT4 dans les cellules germinales. Chez la souris il a été montré que l'inhibition de la voie WNT/ $\beta$ -caténine spécifiquement dans les cellules somatiques de l'ovaire retardait le processus de différenciation des cellules germinales femelles (maintien des marqueurs de pluripotence comme SSEA1 et OCT4) (Le Rolle et al., 2021). Ainsi, chez le lapin, l'expression somatique de DMRT1 dans les stades précoces du développement ovarien pourrait être impliquée dans la régulation de la voie WNT/ $\beta$ -caténine, et le processus de différenciation des cellules germinales.

- **DMRT1 et différenciation des cellules germinales**

En plus de son rôle via les cellules somatiques sur la différenciation de la lignée germinale, DMRT1 est aussi exprimé directement par les cellules germinales XX et XY. En effet, dans l'ovaire, alors que DMRT1 disparaît des cellules somatiques, son expression augmente dans les cellules germinales (dès 20 jpc) (**figure 18C**) et est maintenue jusqu'à leur entrée en méiose avant de disparaître progressivement.

L'étude des ovaires XX *DMRT1*<sup>-/-</sup> (ainsi que des « ovaires » XY *DMRT1*<sup>-/-</sup>) montre une anomalie du déroulement de la méiose des cellules germinales qui restent bloquées en pré-leptotène (**figure 24**, 3 jpp) (pour une description de la méiose chez le lapin, voir (Daniel-Carlier et al., 2013)). Par la suite, bien que plusieurs cellules germinales soient encore présentes, les cordons ovigères ne se fragmentent pas et aucun follicule n'est observé (**figure 24**, 18 jpp). Ainsi, la folliculogenèse ne peut se mettre en place en absence de cellules germinales méiotiques, laissant supposer l'existence d'un signal entre les ovocytes I et les cellules somatiques alentours. Au stade adulte, plus aucune cellule germinale n'est observée. Les gonades *DMRT1*<sup>-/-</sup> présentent de nombreuses cellules de type lutéal et des structures de type cordonal sont présentes dans la medulla (**figure 24**, adulte). En conclusion, en absence d'expression de *DMRT1*, les lapines sont infertiles.

Chez la souris, DMRT1 est aussi exprimé dans les cellules germinales préméiotiques, où il apparaît contrôler l'expression du gène *Stra8* nécessaire à l'entrée en méiose (Baltus et al., 2006; Feng et al., 2021). Le KO de *Dmrt1* chez la souris réduit en effet grandement l'expression de *Stra8* dans l'ovaire fœtal, mais de nombreuses cellules germinales initient la méiose, et suffisamment de follicules ovariens sont formés pour qu'à l'âge adulte les femelles soient fertiles. Une subfertilité est néanmoins observée, à mettre en relation avec une diminution du nombre de follicules (Krentz et al., 2011). Chez l'humain un seul cas d'IOP pouvant être attribuée à l'hémizygotie de *DMRT1* a été rapporté (Bartels et al., 2013). Nos résultats peuvent augmenter l'intérêt pour ce facteur de transcription chez les patientes atteintes d'insuffisance ovarienne. Dans le modèle lapin, le rôle de DMRT1 dans le contrôle du processus méiotique constitue l'un des sujets d'études de Namya Mellouk, chargée de recherche nouvellement recrutée dans l'équipe (2021).



**Figure 24. Effets de l'inactivation de *DMRT1* dans les gonades de lapin après la naissance.** A 3 jpp dans un ovaire contrôlé, les cellules germinales sont regroupées au sein de cordons ovigères. On distingue une avancée dans le processus méiotique avec des cellules en pré-leptotène (PL), leptotène (L) et zygotène (Z). Dans les gonades XX et les XY *DMRT1*<sup>-/-</sup>, la méiose est amorcée, mais les cellules germinales apparaissent bloquées au stade pré-leptotène (PL). A 18 jpc, les cellules germinales XX sont bloquées au stade diplotène (D) de méiose I dans les ovaires contrôlés. Les premiers follicules ovariens (F) sont en cours de formation selon un gradient centrifuge (depuis le centre vers la périphérie). Dans les gonades *DMRT1*<sup>-/-</sup>, les quelques cellules germinales restantes ne s'entourent pas d'une assise de cellules somatiques : les follicules ovariens ne se forment pas. Chez l'adulte, les gonades sont dépourvues de cellules germinales. Des structures en cordons sont observées ainsi que des cellules semblables à celles retrouvées dans les corps jaunes d'un ovaire contrôlé (CL, Cellule Lutéale). Barres d'échelle : 50 μm.

Par ailleurs, *DMRT1* est aussi exprimé par les cellules germinales XY dans le testicule. De façon inattendue, une infertilité secondaire apparaît chez les mâles hétérozygotes *DMRT1*<sup>+/-</sup> au cours du vieillissement. Cette infertilité est plus ou moins précoce en fonction des individus, mais apparaît en moyenne vers l'âge de 2 ans, et est marquée par un arrêt total de la spermatogenèse. Chez la souris, il a été montré que *DMRT1* était impliqué dans le contrôle du maintien/renouvellement des spermatogonies souches dans le testicule adulte (Matson et al., 2010; Zhang et al., 2016) et l'inhibition de l'entrée en méiose (Matson et al., 2010). Le second volet de la thèse d'Emilie Dujardin consiste (i) à étudier l'expression de *DMRT1* dans les cellules germinales au cours du développement testiculaire du lapin et (ii) à analyser la différenciation des cellules germinales XY et leur maintien chez les hétérozygotes *DMRT1*<sup>+/-</sup>.

## 5. Discussion– Perspectives

### Rôles multiples de DMRT1 dans le testicule et dans l’ovaire

---

Chez le lapin, il apparaît donc que DMRT1 joue différents rôles dans les cellules somatiques XY et XX, mais aussi dans les cellules germinales des deux sexes qui ont pourtant des destins très différents. Ces observations, ainsi que celles accumulées chez la souris depuis de nombreuses années montrent la diversité des fonctions exercées par DMRT1 au cours de la gonadogénèse et de la gamétogénèse. Compte tenu de cette diversité, la question du mode d’action de DMRT1 se pose. Par exemple, d’un point de vue mécanistique, comment DMRT1 peut-il favoriser l’arrêt mitotique des cellules germinales XY en période fœtale, puis au contraire activer la mitose des (pro)spermatogonies après la naissance (Fahrioglu et al., 2007; Krentz et al., 2009) ? ou bien comment DMRT1 aide-t-il à maintenir les cellules spermatogoniales souches tout en favorisant par ailleurs la différenciation et la prolifération des spermatogonies (Matson et al., 2010; Zhang et al., 2016) ? Plus intrigant encore, comment DMRT1 peut-il réprimer l’expression de *Stra8* dans les spermatogonies (Matson et al., 2010), alors qu’il l’active dans les ovogonies (Krentz et al., 2011; Matson et al., 2010)? Sur la base de sa capacité à déclencher la reprogrammation du destin cellulaire de cellules différenciées (cellules de la granulosa qui transdifférencient en cellules de type Sertoli quand DMRT1 est surexprimé dans un ovaire adulte), le laboratoire de D. Zarkower postule depuis plusieurs années que DMRT1 pourrait agir en tant que facteur pionnier (Lindeman et al., 2015). Selon cette hypothèse, DMRT1 permettrait l’ouverture de domaines chromatiniens fermés pour d’autres régulateurs transcriptionnels. Ainsi, son interaction avec des protéines partenaires, qui ont des fonctions plus spécialisées et une expression plus restreinte, pourrait permettre à DMRT1 de remplir des fonctions de régulation spécifiques au contexte cellulaire.

### DMRT1, un facteur pionnier ?

---

Les facteurs pionniers constituent une classe particulière de facteurs de transcription. Ils interviennent notamment lors des stades précoces du développement embryonnaire, au cours desquels ils dirigent la transcription des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire (King and Klose, 2017). Contrairement aux facteurs de transcription classiques, les facteurs pionniers ont la capacité de reconnaître et lier leurs sites de fixation malgré un environnement chromatinien défavorable dans lequel leur site est masqué par les nucléosomes. Une dizaine de facteurs pionniers sont aujourd’hui connus (SOX2, OCT4, KLF4, FOXA1...) (pour revue (Iwafuchi-Doi, 2019)), mais il existe un grand nombre de candidats potentiels dont le statut n’est pas encore complètement établi. Au niveau mécanistique, la fixation des facteurs pionniers sur l’ADN entraîne un déplacement de l’histone H1 linker, favorisant la décompaction de la chromatine, puis le recrutement de co-facteur(s) remodelant permettant l’éviction ou le déplacement des nucléosomes (Zaret, 2020). Il a de plus été montré que certains facteurs pionniers pouvaient constituer des pré-marqueurs d’enhancer : la chromatine est ouverte, mais les marques épigénétiques caractéristiques des enhanceurs actifs ne sont pas

encore déposées (H3K27ac...) (Kim et al., 2018). C'est après la fixation des facteurs de transcription spécifiques que l'activation de l'enhancer se manifeste.

En ce qui concerne DMRT1, Lindeman et collaborateurs (2021) ont récemment pointé SOX9 comme candidat de choix pour agir avec DMRT1 dans ses rôles somatiques chez le mâle (Lindeman et al., 2021). En particulier, ils montrent que ces deux facteurs ont de nombreuses cibles communes, et qu'en absence de DMRT1, SOX9 ne peut se fixer sur ces cibles. Toutefois, chez la souris, le rôle pionnier de DMRT1 pour SOX9 ne s'exercerait qu'après la naissance. DMRT1 n'est en effet pas nécessaire à l'action masculinisante de SOX9 en période fœtale (cf. absence de phénotype dans le testicule fœtal *Dmrt1*<sup>-/-</sup> chez la souris, (Raymond et al., 2000)). L'explication avancée par les auteurs est que la chromatine serait dans un état plus permissif chez le fœtus, permettant à SOX9 d'agir directement sur ses cibles. Cette hypothèse s'appuie notamment sur la description d'un profil chromatinien similaire dans les précurseurs des cellules de soutien XX et XY, où de nombreuses régions communes présentent une structure ouverte (Garcia-Moreno et al., 2019). Néanmoins, si un paysage épigénétique particulier se dessine dans ces précurseurs, il est vraisemblable que certains facteurs communs aux deux sexes soient intervenus de façon à « primer » les régions clés pour la suite du programme mâle ou femelle. On peut alors proposer que d'autres facteurs jouent un rôle pionnier en période fœtale, et qu'ils sont susceptibles de suppléer à l'absence de DMRT1 chez la souris. Il pourrait s'agir d'un autre facteur DMRT, comme DMRT3 qui est exprimé dans les précurseurs de soutien des deux sexes (Jameson et al., 2012) ; ou un autre facteur plus générique de la gonade comme GATA4 dont le rôle pionnier a été démontré dans le foie (Zaret and Carroll, 2011).

### **DMRT1 et activation de l'expression de SOX9**

---

A l'aune de ces hypothèses et de nos résultats, nous proposons que DMRT1 est un facteur pionnier chez le lapin qui permettrait à SOX9 d'agir sur ses cibles. Ce rôle s'exercerait néanmoins dès la période fœtale chez cette espèce, pour promouvoir la différenciation des cellules de Sertoli. En accord avec cette idée, bien que de la protéine SOX9 puisse être détectée dans les gonades homozygotes mutantes XY *DMRT1*<sup>-/-</sup>, celle-ci ne peut activer (ou réprimer) ses cibles en absence de son facteur pionnier (absence d'expression d'*AMH* par exemple). Nous postulons par ailleurs que DMRT1 agisse aussi comme facteur pionnier pour SRY. SOX9 et SRY appartiennent en effet à la même famille de facteurs de transcription et partagent des cibles communes sur l'ADN (Li et al., 2014). Dans notre hypothèse, DMRT1 serait requis pour ouvrir la chromatine au niveau de l'enhancer 13 et permettre à SRY de se fixer sur l'ADN (**figure 25A**). En absence de DMRT1, la conformation chromatinienne ne permettrait pas à SRY de se fixer de façon optimale et l'expression de SOX9 ne serait que faiblement activée (**figure 25B**). En accord avec cette hypothèse des niveaux considérables de transcrits SRY sont détectés chez les XY homozygotes mutants (*DMRT1*<sup>-/-</sup>), sans pour autant que cette surexpression de SRY ait un impact sur la différenciation gonadique : en absence de DMRT1, SRY ne peut agir. Dans une gonade XX, l'expression de *DMRT1* est réprimée dans les cellules somatiques lorsque celle de *FOXL2* est activée (**figure 25C**). Ainsi en absence de DMRT1, l'expression de SOX9 ne peut pas être up-régulée et on peut par ailleurs

supposer que FOXL2 (et ESR1/ESR2 ?) pourrait venir réprimer l'expression de *SOX9* comme ce qui a pu être montré dans l'ovaire de souris (Georges et al., 2014; Nicol et al., 2018a). Enfin, nos analyses réalisées chez la chèvre, montrent qu'en absence de FOXL2 dans la gonade XX (chèvre XX PIS<sup>-/-</sup> ou XX FOXL2<sup>-/-</sup>), un maintien de l'expression de *DMRT1* est observé (Elzaïat et al., 2014). On peut alors proposer que DMRT1 maintiendrait une ouverture chromatinienne de l'enhancer 13 suffisamment longtemps pour que le peu d'expression de *SOX9*/*SOX9* existant dans une gonade XX puisse s'accumuler et agir à la place de SRY pour autopromouvoir son activation (**figure 25D**). En accord avec cette hypothèse, un délai d'environ 4 à 5 jours pour l'initiation de la formation des cordons séminifères est observé chez les XX homozygotes mutants pour FOXL2 (XX PIS<sup>-/-</sup>) par rapport à la cinétique décrite classiquement dans un testicule XY (Pailhoux et al., 2002).

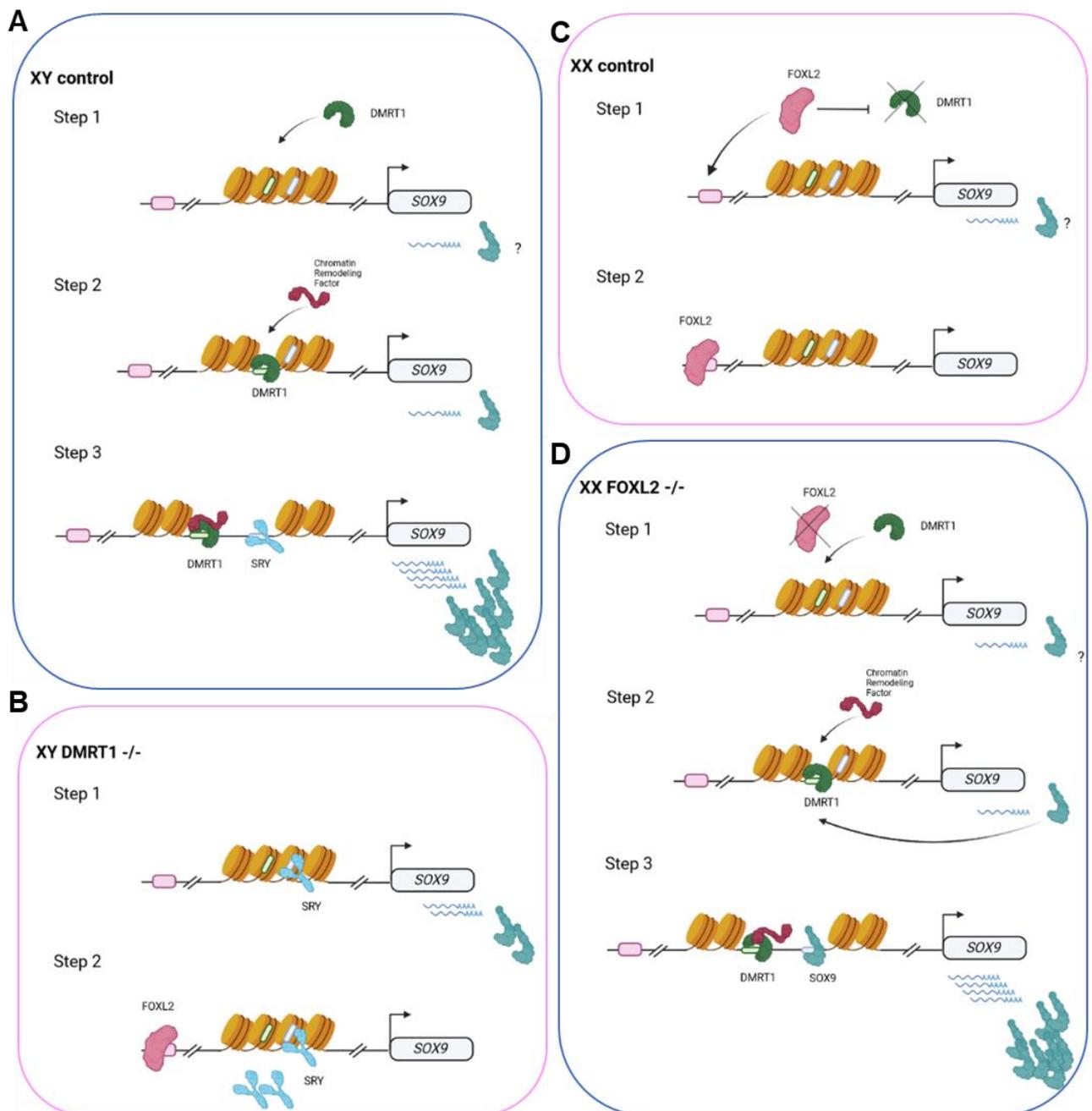


Figure 25. Modèle alternatif de la détermination du sexe chez les mammifères. A. Dans une gonade XY contrôle, la conformation de la chromatine en amont du gène *SOX9* est plutôt répressive ou peu permissive. Une activité transcriptionnelle de base, très faible, existe néanmoins pour le gène *SOX9* (et ceci dans les gonades des deux sexes). DMRT1 peut se fixer sur son site présent au niveau de

l'enhancer 13 (pastille verte) bien qu'il soit empaqueté dans un nucléosome (step 1). En tant que facteur pionnier, il recrute des facteurs de remodelage de la chromatine qui vont permettre l'ouverture du domaine chromatinien autour de l'enhancer 13 (éviiction de l'histone H1 et déplacement des nucléosomes) (step 2). Le site de fixation pour SRY est alors exposé et accessible (pastille bleue), et SRY peut se fixer et activer l'expression de *SOX9* (step 3). **B.** Dans une gonade XY *DMRT1*<sup>-/-</sup>, la conformation chromatinienne ne permet pas à SRY de se fixer correctement et d'exercer pleinement ses fonctions sur l'activation transcriptionnelle de *SOX9* (step 1). Ainsi une moindre activation de l'expression de *SOX9* est obtenue, et moins de protéine est produite. En absence de *DMRT1*, *SOX9* ne peut activer ses cibles et les gonades XY *DMRT1*<sup>-/-</sup> entrent dans un processus de différenciation ovarienne. L'expression de *FOXL2* pourrait alors venir réprimer la transcription de *SOX9* en se fixant sur l'enhancer 8, situé à 838 kb du gène *SOX9* (pastille rose) tel que décrit dans l'ovaire fœtal de souris ou les cellules de granulosa (ChIP-seq *FOXL2*, (Georges et al., 2014; Gonen et al., 2018; Nicol et al., 2018b)) (step 2). **C.** Dans la gonade XX contrôle, *FOXL2* réprime l'expression de *DMRT1* (step 1) et réprime l'expression de *SOX9* (step 2). **D.** Dans une gonade XX *FOXL2*<sup>-/-</sup> ou XX *PIS*<sup>-/-</sup> (modèle caprin), en absence de *FOXL2*, *DMRT1* continue à être exprimé (step 1). *DMRT1* peut alors se fixer sur l'enhancer 13 et recruter des facteurs de remodelage chromatinien pour déplacer les nucléosomes et ouvrir la chromatine, exposant le site de liaison pour SRY. L'activité transcriptionnelle basale de *SOX9* continue, et la protéine *SOX9* s'accumule dans les cellules somatiques XX. *SOX9* et SRY partageant les mêmes sites de fixation, *SOX9* peut alors se fixer sur l'enhancer 13 en conformation permissive et activer sa propre transcription (step 3). Created with BioRender.com

Afin de pouvoir démontrer ce modèle, il faut à présent caractériser les paysages épigénétiques des gonades fœtales de lapin en fonction de l'expression ou non de *DMRT1* (comparaison de gonades contrôles et *DMRT1*<sup>-/-</sup>). Deux approches complémentaires sont à privilégier : l'étude de l'ouverture chromatinienne et l'analyse de l'état d'activation des régions régulatrices. La technique d'ATAC-seq utilisée à un stade précoce du développement gonadique permettra d'apprécier l'état d'ouverture de la chromatine spécifique à la gonade XX ou XY et de caractériser les sites dont l'ouverture est associée à l'expression de *DMRT1* (comparaison contrôles/*DMRT1*<sup>-/-</sup>). Dans un deuxième temps, l'évaluation des modifications d'histones enrichies au niveau de ces sites permettra de renseigner l'état d'activation des régions régulatrices putatives. Afin d'étudier le profil de différentes marques épigénétiques (modifications d'histones) sur des quantités restreintes de matériel biologique, nous développons dans l'équipe les techniques de CUT&RUN et de CUT&TAG (financement du département PHASE, API 2021 EpiNEXT, collaboration intraBREED avec l'équipe EPEE). Pour étudier la régulation épigénétique de l'expression des gènes, plusieurs marques d'histones retiennent notre attention : H3K4me3 (promoteurs actifs), H3K4me1 (enhancers « primés »), H3K27ac (enhancers et promoteurs actifs), H3K27me3 (enhancers et promoteurs réprimés). Des difficultés sont actuellement rencontrées avec la technique de CUT&RUN (digestion Mnase aléatoire), tandis que la technique de CUT&TAG semble plus prometteuse (digestion avec la transposase Tn5) (Kaya-Okur et al., 2019). Une fois la technique validée à partir de 10 000 à 50 000 noyaux par marque d'intérêt, les profils épigénétiques de ces différentes marques pourront être étudiés au moment de la différenciation du sexe gonadique chez des fœtus contrôles et *DMRT1*<sup>-/-</sup>. Néanmoins, pour pouvoir travailler à partir de gonades « pures » (séparées du mésonéphros adjacent), le stade le plus précoce qui pourra être étudié est le stade 16 jpc, où les cordons séminifères sont déjà observés chez les XY et où *RSPO1* est déjà surexprimé dans la gonade XX. Pour pouvoir réaliser une analyse pertinente à des stades plus précoces il nous faudrait utiliser une approche « single-nucleus » de type ATAC-seq single-nucleus ou multiomiques single-nucleus combinant ATAC-seq et RNA-seq, (en cours de développement dans l'équipe). Ces approches pourraient présenter une solution pour étudier la détermination du sexe selon une cinétique de développement : 12, 14, 16, 18 jpc dans les gonades XY et XX, depuis l'allumage de l'expression de *SRY* chez les mâles, jusqu'à l'expression de *FOXL2* chez les femelles.

## DMRT1 et différenciation ovarienne

Dans les gonades femelles, le rôle somatique de DMRT1 reste plus mystérieux. Un lien possible avec la voie WNT/ $\beta$ -caténine est suspecté ce qui pourrait avoir des répercussions sur la différenciation des cellules germinales. Néanmoins DMRT1 étant exprimé aussi par les gonocytes, il est difficile de distinguer un rôle direct, d'un rôle indirect. De façon plus discrète, il est aussi noté une diminution significative de l'expression de deux enzymes de la stéroïdogénèse *CYP11A1* et *CYP17A1*, ainsi qu'une diminution de *DHH* qui a été montré chez la souris comme étant impliqué dans la différenciation des cellules des thèques et ainsi dans la production de testostérone par l'ovaire (Liu et al., 2018) (**figure 26**).

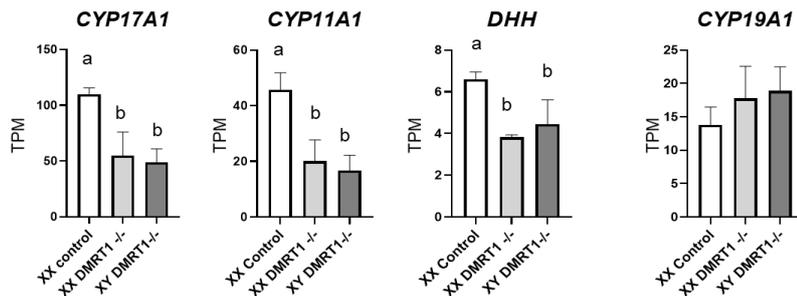


Figure 26. Niveau d'expression de *CYP17A1*, *CYP11A1*, *DHH* et *CYP19A1* à 20 jpc dans les ovaires XX contrôles, XX *DMRT1*<sup>-/-</sup> et XY *DMRT1*<sup>-/-</sup>. Résultats issus des analyses de RNA-sequencing. TPM : Transcripts Per Million. Les lettres font apparaitre les différences statistiquement significatives entre conditions (Benjamini Hochberg adjusted pValue < 0.05).

DMRT1 serait-il impliqué dans la différenciation des cellules stéroïdogènes de l'ovaire foetal de lapin ? L'expression de *CYP19A1/aromatase* produite par un autre type cellulaire n'est, par contre, pas affectée. Mais si la production de testostérone diminue, un déficit de synthèse d'estrogènes pourrait en résulter. Il serait alors intéressant de doser la production de  $17\beta$ -estradiol dans l'ovaire foetal *DMRT1*<sup>-/-</sup> lors des premiers stades de développement ovarien. Chez le lapin, il existe en effet une production d'estrogènes dans l'ovaire foetal avant l'entrée en méiose des cellules germinales et nous avons montré par la réalisation d'un KO de *CYP19A1/Aromatase* (TALE nucléase) que l'absence d'estrogènes impactait la prolifération des cellules somatiques de l'ovaire qui présente une taille réduite et développe une réserve folliculaire restreinte (Jolivet et al., 2022). L'une des particularités du lapin par rapport à ce que nous avons précédemment montré chez la chèvre ou chez le poulet, est que l'expression de *CYP19A1/aromatase* débute avant celle de *FOXL2* (**figure 27A**). Il a par ailleurs été montré que le pic de synthèse d'estrogènes dans l'ovaire était atteint à 20 jpc puis diminue en l'espace de quelques jours (Gondos et al., 1983). En relation avec ce pic d'estrogènes dans un ovaire contrôle, l'expression de *FOXL2* est grandement augmentée entre 20 et 22 jpc, alors que celle de *DMRT1* continue de diminuer (**figure 27A et B**). Dans les gonades XX *CYP19A1*<sup>-/-</sup>, l'expression de *FOXL2* s'initie, mais est drastiquement réduite en absence d'estrogènes : l'augmentation de son expression entre 20 et 22 jpc, n'est pas observée. Nous avons dernièrement étudié l'expression de *DMRT1* dans ces mêmes gonades et avons ainsi pu observer que son expression était quant à elle maintenue entre 20 et 22 jpc dans les ovaires *CYP19A1*<sup>-/-</sup> (**figure 27B**), sans toutefois que l'expression de *SOX9* soit induite dans l'ovaire (Jolivet et al., 2022).

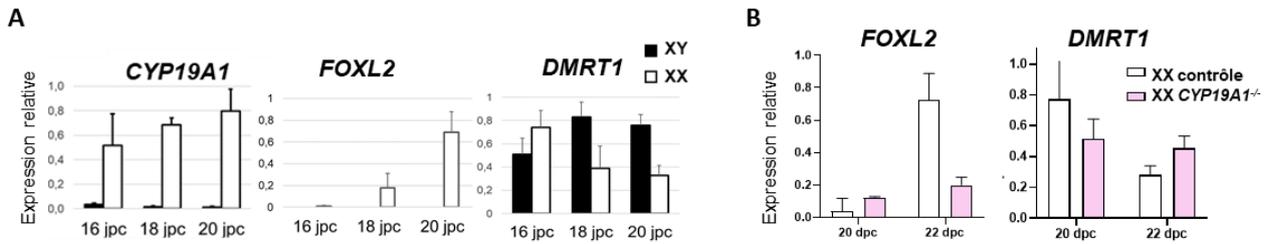


Figure 27. Expression de *CYP19A1*, *FOXL2* et *DMRT1* dans l'ovaire fœtal de lapin. A. Expression à 16, 18 et 20 jpc dans les gonades de *CYP19A1*, *FOXL2* et *DMRT1* (RT-qPCR). *CYP19A1* est exprimé dès 16 jpc dans l'ovaire, avant *FOXL2*. L'expression de *DMRT1* diminue dans l'ovaire quand l'expression de *FOXL2* débute (18 jpc). B. Expression de *FOXL2* et *DMRT1* dans des ovaires *CYP19A1*<sup>-/-</sup> à 20 et 22 jpc. Alors que l'expression de *FOXL2* augmente et que celle de *DMRT1* diminue entre 20 et 22 jpc dans les ovaires contrôles, une « stagnation » de l'expression de *FOXL2* et de *DMRT1* est observée dans les gonades *CYP19A1*<sup>-/-</sup>.

Les interrelations entre *DMRT1*, *FOXL2* et les estrogènes ont été explorées chez plusieurs espèces.

Chez le poulet, l'équipe de M. Clinton a clairement démontré par CRISPR/Cas9 que *DMRT1* était le déterminant du testicule (Ioannidis et al., 2021). La perte d'une dose de *DMRT1* dans une gonade ZZ (*DMRT1*<sup>+/-</sup>), induit l'expression de *FOXL2* et l'activation de la différenciation ovarienne (inversion sexuelle). Ainsi, *DMRT1* réprime l'expression de *FOXL2* dans la gonade mâle. Mais, dans les premiers stades de la différenciation gonadique, *DMRT1* est aussi exprimé dans l'ovaire (ZW) par les cellules somatiques. Au cours de la différenciation ovarienne, l'expression de *DMRT1* diminue de façon concomitante à l'augmentation de celle de *FOXL2* et de l'activation de la synthèse d'estrogènes (activation de l'expression de *CYP19A1* par *FOXL2*) (Zhao et al., 2022). D'après leurs expériences (utilisation d'inhibiteur de l'aromatase chez un ZW qui induit le maintien de l'expression de *DMRT1*), l'équipe de M. Clinton conclue que ce sont les estrogènes qui répriment *DMRT1*. Néanmoins, il me semble qu'il pourrait tout autant s'agir de *FOXL2* (l'expression de *FOXL2* étant elle-même régulée par les estrogènes) ou d'une action commune des deux.

Chez la chèvre, nous avons montré dans une gonade XX, qu'en absence d'expression de *FOXL2*, *CYP19A1* /aromatase ne s'exprimait pas et que l'expression de *DMRT1* augmentait conduisant à l'activation de *SOX9* et la différenciation testiculaire (Elzaiat et al., 2014; Pailhoux et al., 2002). Compte tenu de la chronologie d'expression des gènes, il est hautement probable que ce soit *FOXL2* qui soit responsable de l'inhibition de *DMRT1* dans l'ovaire en différenciation, mais une action conjointe avec les estrogènes, qui viendraient renforcer l'effet répressif, n'est pas à exclure.

Chez la souris, les expériences de ChIP-seq réalisées à partir d'ovaire fœtal montrent que *FOXL2* peut se fixer directement sur le promoteur de *DMRT1* (Nicol et al., 2018b). Néanmoins, une dérégulation de l'expression de *DMRT1* en relation avec la sous-expression de *FOXL2* dans l'ovaire (KO de *Foxl2*) (Garcia-Ortiz et al., 2009) ou sa surexpression dans une testicule (Nicol et al., 2018b) n'a jamais été mise en évidence dans la gonade fœtale de souris.

Chez le lapin, les relations entre ses trois intervenants dans l'ovaire n'est pas encore claire. Les estrogènes pourraient tout à la fois réprimer *DMRT1* et up-réguler *FOXL2*, mais *DMRT1* pourrait aussi réprimer *FOXL2* et

FOXL2 réprimer *DMRT1*. Néanmoins, grâce au modèle lapin, nous avons pu démontrer l'une des hypothèses issues de notre travail chez la chèvre, à savoir que **DMRT1 était bien un facteur déterminant du testicule chez les mammifères**. Mais, les liens et fonctions de FOXL2, CYP19 et DMRT1 dans l'ovaire de lapin pourraient être différents de ce que nous avons décrits chez la chèvre. Il apparaît que la différenciation et la morphogenèse précoce de l'ovaire présente une grande diversité chez les mammifères. Il nous faut aujourd'hui mieux caractériser cette étape chez le lapin. Différentes expériences de single-cell RNAseq et de multiomique single-nucleus (ATAC-seq et RNA-seq) ont été réalisées ou vont être prochainement développées à différents stades de la morphogénèse ovarienne. Ces projets initiés à l'origine pour mieux décrire le processus de gamétogenèse chez le lapin (voir le détail dans l'axe 2 ci-après) pourront apporter un éclairage substantiel sur les populations somatiques de l'ovaire et leurs états de différenciation au cours de ce processus.

---

Au cours des dernières années, plusieurs aspects de mes recherches bien qu'initiés pour des questionnements sur la différenciation de la lignée des cellules de soutien m'ont conduit aussi à m'intéresser à la lignée germinale. En parallèle, de ce premier axe de recherche, j'ai initié plusieurs projets directement en lien avec la différenciation des cellules germinales femelles (lapin) et mâles (ruminants et lapins). Pour deux d'entre eux, isoler des populations/sous populations de cellules germinales a été nécessaire pour appréhender leur transcriptome et/ou méthylome. Cet aspect a nécessité le développement de différentes approches méthodologiques qui ont constitué une grande partie de mon travail en tant que principale investigatrice, encadrante et coordinatrice de projet.

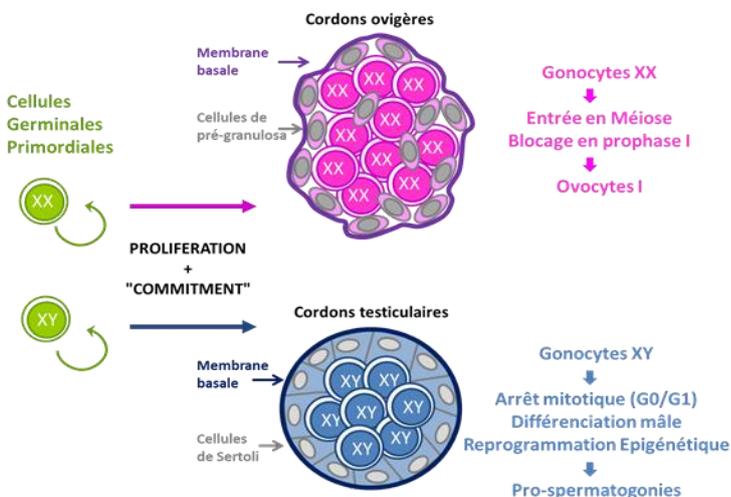
## C. AXE 2

### DIFFERENCIATION DE LA LIGNEE GERMINALE ET FERTILITE

#### Introduction, Historique et Objectifs

Chez les mammifères, la fertilité d'un individu ainsi que la transmission à sa descendance d'informations génétiques et épigénétiques de qualité, sont intimement liées au bon déroulement de la différenciation des gonades et en particulier de la lignée germinale. Dans les gonades, un dialogue harmonieux entre les cellules germinales et leurs cellules somatiques environnantes est indispensable et débute dès la vie fœtale par la détermination de leur devenir. Lorsque les premières cellules germinales colonisent les crêtes génitales, ces dernières sont encore indifférenciées. La détermination du sexe s'initie néanmoins rapidement et les cascades génétiques caractéristiques de l'un ou l'autre sexe se mettent en place afin d'orienter les gonades vers une différenciation testiculaire ou ovarienne. Ce sont les cellules somatiques, principalement les cellules de soutien du testicule (Sertoli) ou de l'ovaire (pré-granulosa), qui vont orchestrer ces processus morphogénétiques et qui sont à l'origine de l'orientation du devenir des cellules germinales vers une différenciation de type mâle (prospermatogonies) ou femelle (ovocytes).

Les cellules germinales primordiales (CGP) sont spécifiées à l'extérieur de l'embryon, à la base de l'allantoïde, puis vont migrer à travers l'embryon jusqu'aux crêtes génitales. Au cours de ce processus, la méthylation de l'ADN des CGP s'efface progressivement pour atteindre son plus bas niveau au moment où les cellules



germinales (gonocytes) entrent dans une voie de différenciation « femelle » (entrée en méiose) ou « mâle » (arrêt mitotique, perte des marqueurs de totipotence, différenciation et initiation de la reméthylation du génome) (**figure 28**) (Seisenberger et al., 2012).

Figure 28. Premières étapes de différenciation des cellules germinales en fonction du sexe gonadique.

Dans l'ovaire, les ovocytes I ainsi différenciées ne vont débiter la reméthylation de leur génome que lors de la maturation ovocytaire au cours de la croissance folliculaire. Dans le testicule, les pro-spermatogonies vont maturer en spermatogonies après la naissance puis entrer en méiose lors de la puberté. Ces processus sont bien décrits chez la souris, mais restent encore peu documentés, voir inconnus chez le lapin ou les ruminants. Les difficultés auxquelles nous sommes confrontés chez ces espèces sont liées (i) à l'asynchronie de ces processus au sein des cellules, mais aussi (ii) à l'absence d'outils permettant de sélectionner les populations d'intérêt.

Trois projets ont été développés sur (i) l'initiation de la méiose dans l'ovaire fœtal de lapin, (ii) la reprogrammation épigénétique des cellules germinales mâles chez les ruminants (période fœtale, post-natale et adulte) et (iii) le rôle des estrogènes sur la spermatogénèse dans le testicule adulte de lapin.

Ce dernier aspect ne sera néanmoins pas détaillé plus loin dans le rapport. Il a fait l'objet du stage de master 2 d'Audrey Albina que j'ai encadré (sept/oct 2019, puis janvier à juin 2020). Ce sujet fait suite au développement de la lignée de lapins mutante pour le gène *CYP19A1* précédemment évoquée (Jolivet et al., 2022). En plus d'être synthétisés dans l'ovaire, les estrogènes sont aussi produits dans le testicule adulte de lapin par les cellules germinales. L'étude amorcée par Audrey Albina montre qu'en absence d'estrogènes, les mâles *CYP19A1* KO présentent une subfertilité associée à des défauts flagellaires et une diminution de la motilité des spermatozoïdes. J'ai confié la suite de cette étude à Aurélie Dewaele (Assistante Ingénieure dans l'équipe) qui a finalisé ces travaux et une publication est en cours de rédaction (voir page 82).

Ainsi, ne sont détaillés ci-dessous que les deux principaux projets concernant les cellules germinales femelles de lapin et les cellules germinales mâles de ruminants. Ces projets, que j'ai coordonnés, ont mobilisés plusieurs membres de l'équipe DGP et de l'unité BREED.

## **1. Dynamique de différenciation des cellules germinales dans l'ovaire fœtal de lapin**

**Financement CI du département PHASE : CAROT - Cell Atlas of Rabbit Ovarian Transcripts.**

**Responsables Maëlle Pannetier, puis Namya Mellouk**

L'essor des techniques de single-cell RNA-sequencing ces dernières années a permis de mieux caractériser les différentes populations cellulaires, voire les différents états de différenciation d'une lignée de cellules au sein d'un organe entier. En particulier, la technologie chromium proposée par 10XGenomics permet d'obtenir de façon simple de nombreuses données permettant de créer un atlas des cellules composant un organe à un instant donné. Grâce à l'obtention d'un crédit incitatif de notre département INRAE (PHASE, Physiologie et Système d'Elevage) nous avons pu utiliser cette technologie afin de commencer à décrire les trajectoires de différenciation des cellules composant des ovaires fœtaux de lapin. Deux stades de développement ont été choisis correspondant (i) à une phase de prolifération des cellules germinales XX (24 jpc) et (ii) à une phase d'initiation de l'entrée en méiose (28 jpc). Avec l'appui technique de différents membres de l'équipe, nous avons mis au point un protocole de dissociation de gonades fœtales, et des suspensions cellulaires de qualité ont pu être obtenues (80 à 90% de cellules vivantes). Pour chaque stade deux répliques biologiques ont été préparés et 10 000 cellules de chaque suspension cellulaire ont été chargées sur la puce du Chromium de 10XGenomics (plateforme I2BC, CNRS, Gif-sur-Yvette).

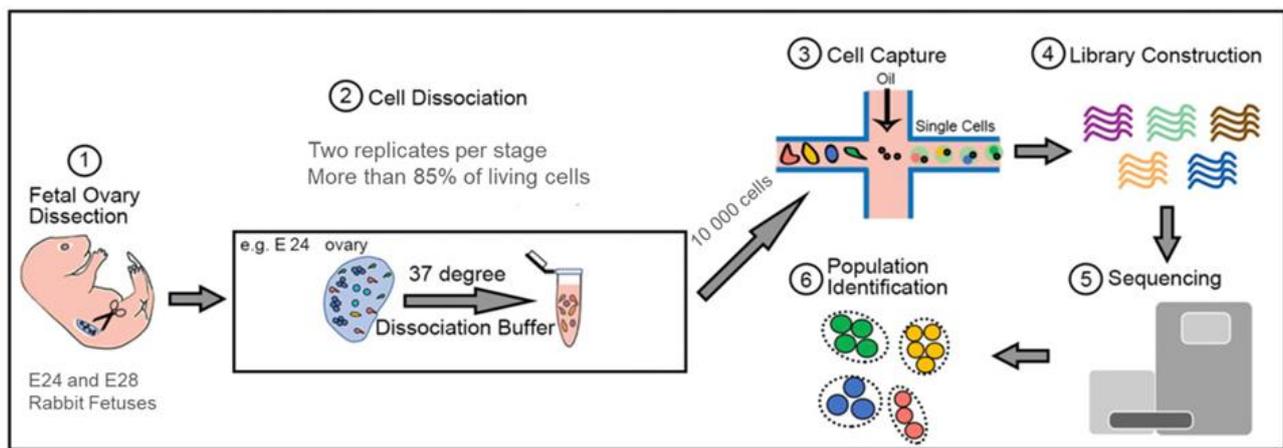
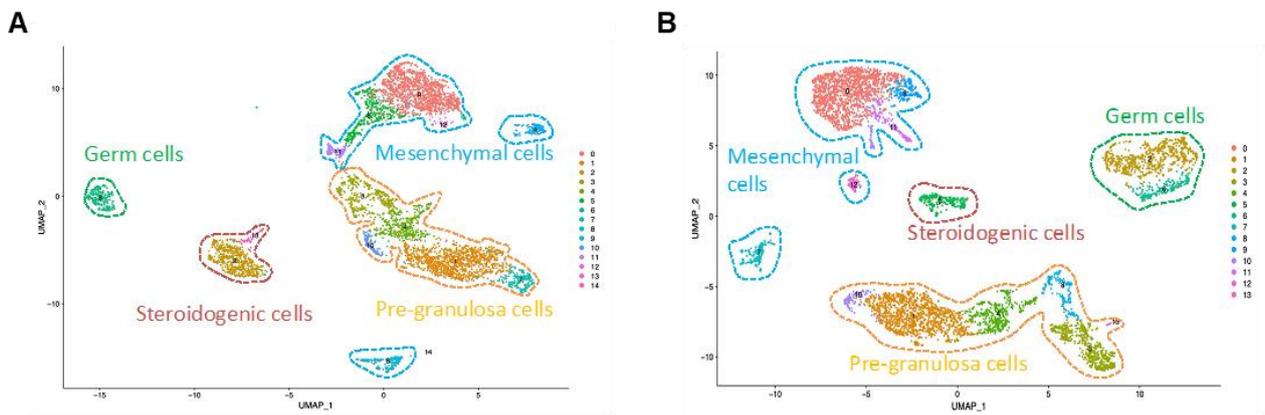


Figure 29. Protocole mis en place pour l'analyse single-cell RNAseq à partir d'ovaire foétaux de lapin à deux stades du développement : 24 et 28 jpc (également noté E24 ou E28).

Après émulsion et individualisation des cellules, une lyse et une transcription inverse du contenu transcriptomique de chaque cellule (identification par des « étiquettes » moléculaires ou UMI, Unique Molecular Identifier) ont été réalisées avec le kit Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent v2 (10X genomics). Pour les quatre échantillons, des banques ont été préparées et séquencées par la plateforme I2BC (>60 000 reads 75PE / cellules) (**figure 29**).

L'obtention des données issues du séquençage a coïncidé avec l'arrivée de notre nouvelle chargée de recherche, Namya Mellouk, début 2021. Ainsi Namya, accompagnée par les bio-informaticiens de l'équipe et de l'unité, prend à présent en charge les analyses de ces données qui constituent une première approche pour encre son sujet sur la différenciation des cellules germinales femelles de lapin. Le traitement informatique des données a d'abord consisté à aligner les « reads », les assigner à des gènes par cellule et à les compter (comptage des UMI) avec le pipeline Cell Ranger v5.0.1 (fourni par 10x Genomics). Les données ont été alignées sur le génome de référence de lapin (OryCun 2.0.101) pour lequel les séquences UTRs ont été étendues et corrigées par l'équipe de bioinformatique à l'aide de données RNAseq disponibles dans les bases de données publiques (amélioration de l'annotation des 5' et des 3' UTR). Sur les 10 000 cellules chargées sur une puce du Chromium, entre 8 000 et 8 500 ont effectivement pu être isolées pour chaque échantillon, ce qui constitue un rendement satisfaisant. La normalisation de l'expression génique, le regroupement et la visualisation UMAP ont été effectués avec le package Seurat et le package ggplot2 sous R (version 4.0.3). Jusqu'à présent les quatre échantillons ont été traités individuellement. L'analyse hiérarchique des différentes populations cellulaires a révélé 15 et 14 clusters distincts à 24 et 28 jpc respectivement. Pour classer chaque population cellulaire, nous avons analysé les profils d'expression transcriptionnelle de marqueurs spécifiques de différents types cellulaires (**figure 30**). Dans un deuxième temps, l'analyse sera affinée en étudiant plus particulièrement les clusters correspondants aux cellules germinales et aux cellules de pré-granulosa notamment, afin d'identifier des sous populations (sous-clusters) et de caractériser la trajectoire de différenciation de ces cellules dans l'ovaire foetal.



**Figure 30. Représentation des clusters cellulaires observés dans un ovaire fœtal de lapin à 24 et 28 jpc.** Analyses préliminaires de données issues de single cell RNA-seq à 24 jpc (A) et 28 jpc (B). Les cellules de l'ovaire fœtal ont été regroupées en différents clusters, en fonction de leur contenu transcriptomique. Ces diagrammes présentent l'analyse d'un seul jeu de données pour chaque stade, bien que des duplicats ont été réalisés à chaque fois. L'identité de chaque cluster est ensuite définie sur la base de marqueurs connus comme étant spécifiques des différents types cellulaires. A 24 jpc, un seul cluster de cellules germinales est observé (cluster 5 en vert), alors que deux clusters (cluster 2 et 9) sont détectés à 28 jpc, certaines cellules germinales ayant débuté leur méiose (marqueurs tels que *STRA8*). De nouvelles analyses des clusters les plus pertinents vont être réalisées (clusters des cellules germinales en particulier), de façon à caractériser et décrire des sous-populations de cellules et comprendre leur trajectoire de différenciation.

Des difficultés liées à la qualité du génome de lapin (version actuelle OryCun2.0.101) sont apparues (problèmes d'assemblage et d'annotation des gènes). L'identification des clusters reposant sur la recherche de marqueurs connus comme étant caractéristiques des différents types cellulaires, leur absence ou mauvaise annotation dans le génome de référence nous freine dans nos analyses. En attendant la publication d'une nouvelle version qui est en cours d'annotation par l'université d'Uppsala (OryCun3.0), nous créons notre propre génome de référence en incrémentant la version actuellement disponible avec nos gènes d'intérêt (identifié parmi les séquences de la version OryCun3.0) ou en réannotant manuellement par homologie de séquence les unités transcriptionnelles non renseignées (recherche d'orthologues...). L'ensemble de ces données devraient nous permettre de préparer une publication courant 2022.

Malgré ces difficultés, cette première expérience dans le domaine des analyses omiques cellule par cellule a convaincu l'équipe de la valeur de cet investissement pour avancer dans la connaissance des processus de différenciation cellulaire. Ainsi, Namya Mellouk va à présent développer une approche « multiomique » sur noyau individuel permettant simultanément d'avoir accès à l'expression des gènes (RNA-seq) et à l'ouverture chromatinienne associée (ATAC-seq) au sein de la même cellule (technologie multiome de 10XGENOMICS). L'utilisation de cette méthode à plusieurs stades de la différenciation de la lignée germinale femelle (depuis la sortie de l'état de pluripotence jusqu'au pic de méiose : stade 20 jpc, 28 jpc, 1 jpp et 9 jpp), nous permettra de décrire les interactions géniques nécessaires à l'établissement du stock d'ovocyte I chez le lapin. Namya a pu obtenir un financement sur ce sujet auprès du département PHASE d'INRAE (Appel à Projet Innovants 2022, DYRECTOME : **D**ynamique de **R**égulation de la **C**hromatine et du **T**ranscriptome dans l'**O**vaire de Lapin en **M**éiose).

## 2. Reprogrammation épigénétique des cellules germinales mâles chez les ruminants

Projet GERMIMÂLE. Financement APIS-GENE 2017-2022. Coordination Maëlle Pannetier.

Collaborations intra-BREED équipes DGP et MECP2 & Société ALLICE.

Comme explicité plus haut, les lignées germinales mâles et femelles subissent un processus de reprogrammation épigénétique au cours de leur différenciation. Lors de leur migration puis de la colonisation des crêtes génitales, les cellules germinales primordiales effacent la méthylation de leur ADN afin d'acquies ultérieurement un nouveau pattern de méthylation spécifique du sexe de la gonade (**figure 31**).

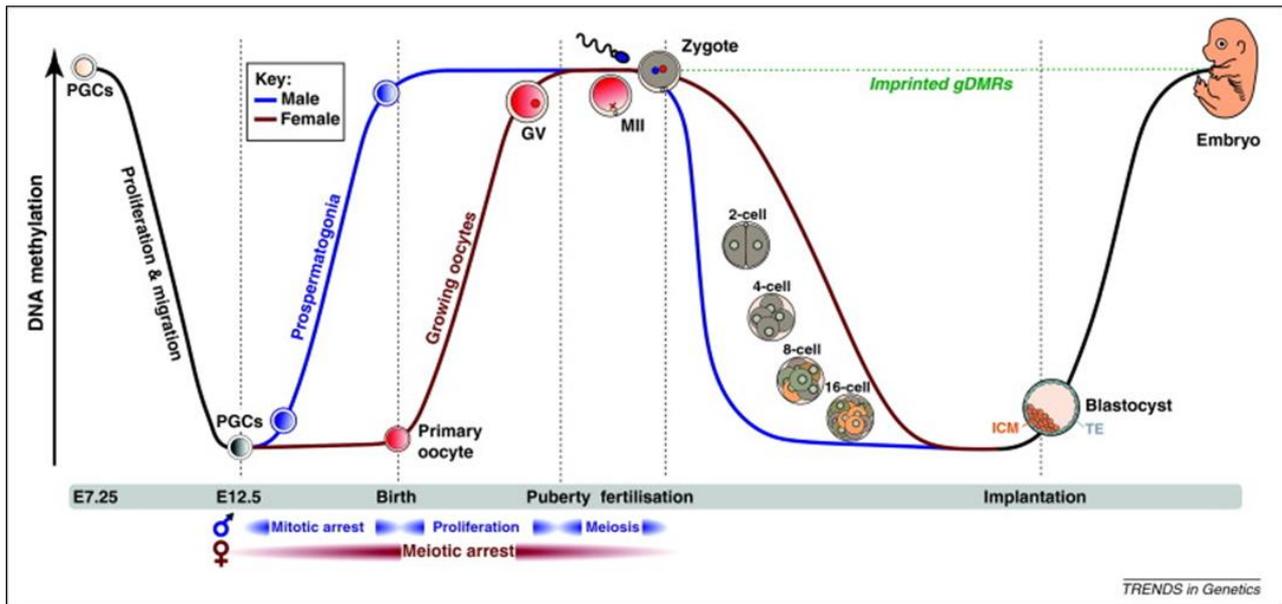
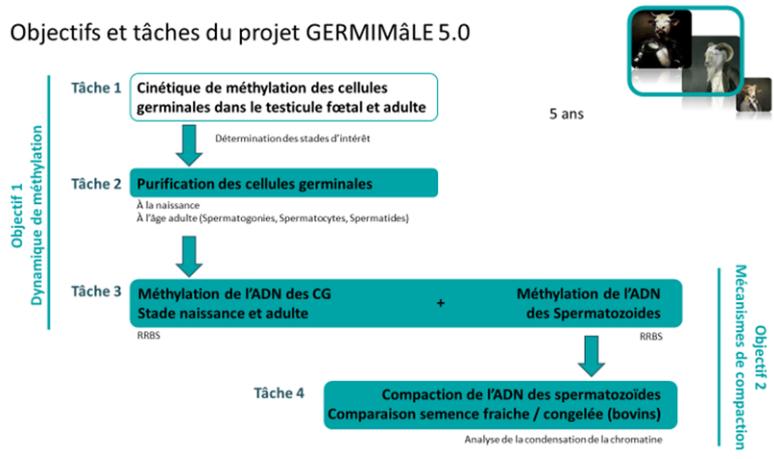


Figure 31. Reprogrammation épigénétique : Dynamique de la méthylation de l'ADN au cours du développement chez la souris (issue de (Smallwood and Kelsey, 2012)). Les cellules germinales primordiales (PGCs, Primordial Germ Cells) se différencient dans l'embryon à E7.5 (Embryonic day 7.5 soit 7,5 jpc). De façon concomitantes à leur prolifération et à leur migration vers les crêtes génitales, les PGC effacent la méthylation de leur ADN (ligne noire). En fonction du sexe génétiques des PGC, un niveau de base de méthylation est néanmoins conservé (7% chez les XX et 14% chez les XY) (Seisenberger et al., 2012). Suite à la détermination du sexe, de nouveaux paysages de méthylation de l'ADN sont établis selon une cinétique et un pattern différent entre les fœtus mâles et femelles. Chez le mâle (ligne bleue), la méthylation *de novo* a lieu avant la méiose dans les cellules qui ont arrêté leurs mitoses (phase G0/G1 ; pro-spermatogonies) et s'achève avant la naissance. Chez la femelle (ligne rouge), les cellules germinales XX entrent en méiose et s'arrêtent au stade diplotène de prophase I (ovocyte I). La méthylation de l'ADN s'établit après la naissance pendant la phase de croissance folliculaire et ovocytaire. À la puberté, sous l'effet de l'axe hypothalamo-hypophysaire, les ovocytes en croissance terminale (GV : Germinal Vesicle) reprennent la première division méiotique quelques heures avant l'ovulation. Après l'expulsion du premier globule polaire, les ovocytes s'arrêtent en métaphase de la deuxième division méiotique (ovocytes MII) et la méiose ne s'achève qu'à la fécondation. Suite à la fécondation, une nouvelle vague de déméthylation de l'ADN se produit, de façon différente en fonction des génomes parentaux. Chez le zygote, la méthylation de l'ADN du génome paternel est rapidement effacée par un mécanisme actif (ligne bleue). La déméthylation du génome maternel est plus lente (ligne rouge) et dépend de la réplication de l'ADN (déméthylation passive). Ces événements de déméthylation post-fécondation n'incluent pas les gDMR des gènes soumis à l'empreinte parentale (germline Differentially Methylated Regions) (ligne pointillée verte). Parallèlement à l'implantation du blastocyste et à la détermination des lignées cellulaires, de nouveaux paysages de méthylation s'établissent.

Ces processus de reméthylation se mettent en place à des stades différents entre mâles et femelles. En particulier chez le mâle, ces processus débutent dès la vie *in utero* et peuvent ainsi être sensibles à des changements de l'environnement maternel (Radford et al., 2014). Ces processus sont bien décrits chez la souris et de mieux en mieux chez l'humain, alors que très peu de choses sont connues chez les ruminants. Une équipe de notre unité (BREED, équipe MECP2, Hélène Kiefer) a néanmoins montré que les spermatozoïdes de taureaux présentaient des niveaux de méthylation plus faibles que ceux de boucs ou de

béliers (40-50% de méthylation chez les taureaux contre 65-70% de méthylation chez les petits ruminants) (Perrier et al., 2018). Par ailleurs s'il est classique de trouver moins de méthylation dans l'ADN des spermatozoïdes que dans celui de cellules somatiques (Yamagata et al., 2007), chez le bovin cette hypométhylation est particulièrement marquée (45-50 % de méthylation dans les spermatozoïdes, contre 80% dans les cellules somatiques). En plus de promoteurs de gènes impliqués dans les processus de différenciation des cellules germinales, ce sont essentiellement les séquences satellites (notamment SAT4) qui sont hypométhylées dans les spermatozoïdes bovins. Cette étude montrait donc qu'il existe des différences entre espèces de ruminants et une analyse approfondie de la reprogrammation épigénétique de la lignée germinale mâle semblait pertinente pour comprendre les spécificités de chacune. Le projet GERMIMÂLE est un programme de recherche collaboratif entre deux équipes de notre unité, DGP et MECP2 (Hélène Kiefer), et une société privée (coopérative d'élevage ALLICE). Notre objectif principal (objectif 1) était de décrire l'acquisition et le maintien de la méthylation dans les cellules germinales XY au cours du



développement testiculaire chez les ruminants (comparaison principalement entre bovins et caprins ; quelques données chez les ovins) (Figure 32). En parallèle les degrés de condensation de la chromatine et de la méthylation de l'ADN spermatique ont été analysés (objectif 2, non détaillé dans ce manuscrit).

Figure 32. Objectifs et tâches du programme GERMIMÂLE. La version 5 du programme est présentée ici, car plusieurs aménagements de tâches et d'objectifs ont dû être formulés auprès de notre financeur APIS-GENE suite aux difficultés techniques ou logistiques rencontrées (programme de 2 ans étendu à 5 ans). CG : Cellules Germinales

Les principaux stades sur lesquels nous souhaitons nous concentrer étaient (i) le stade dit « effacé » où la méthylation du génome des cellules germinales doit être au plus bas ; (ii) le stade naissance, afin de réaliser le bilan des événements de méthylation qui ont eu lieu au cours de la vie *in utero* ; puis (iii) le stade adulte, afin d'évaluer la dynamique de méthylation au cours du processus de spermatogénèse, depuis la spermatogonie jusqu'au spermatozoïde.

### 2.1. Re-méthylation de l'ADN des cellules germinales XY au cours de la vie fœtale.









## 2.2 Méthylation des cellules germinales à la naissance et chez l'adulte : modèle caprin.





**3. Discussion – Perspectives**





---

## CONCLUSION

---

## I. VALORISATION DES TRAVAUX EN COURS

---

Les perspectives issues de mon travail et les nouvelles directions d'investigations imaginées ont été développées dans les chapitres précédents et ne seront pas reprises ici. Pour terminer ce manuscrit, j'expliciterais de façon concise les valorisations prévues ainsi que les projets dans lesquels je m'étais engagée et les solutions envisagées compte tenu de mon départ en disponibilité à l'été 2022. De nombreux projets ont en effet été initiés et vont devoir être finalisés et valorisés dans les prochains mois/années. Certains pourront l'être avant mon départ, d'autres seront finalisés plus tard mais je resterai présente pour les sujets concernant mon étudiante en thèse, Emilie, et la valorisation des données du programme GERMIMâLE. D'un point de vue stratégique, une hiérarchisation dans les projets à traiter est nécessaire. Ainsi quatre projets seront à finaliser en priorité et donneront lieu à 4 articles de recherche.

### 1. Characterization of Estrogen Production and Function in Adult Rabbit Testes.

Aurélie Dewaele, Emilie Dujardin, Frank Giton, Hélène Jammes, Eli Sellem, Marjolaine André, Audrey Albina, Geneviève Jolivet, Maëlle Pannetier, Eric Pailhoux.

Cet article explicite le lieu de production des estrogènes (localisation de l'expression de *CYP19A1* dans les cellules germinales), ainsi que les niveaux de stéroïdes (androstenedione, testostérone et  $17\beta$ -estradiol) produits par un testicule adulte de lapin. Les niveaux d'expression et la localisation des récepteurs *ESR1* et *ESR2* dans le testicule et l'épididyme sont aussi étudiés. L'article décrit en outre le phénotype des lapins mâles *CYP19A1*<sup>-/-</sup> qui présentent une subfertilité (moins de saillies fructueuses et moins de petits par portées). Les paramètres spermatiques sont affectés en absence d'estrogènes, avec une diminution de la motilité des spermatozoïdes en relation avec une augmentation des défauts flagellaire. D'autres anomalies comme l'augmentation des gouttelettes cytoplasmiques résiduelles laissent suspecter un défaut de maturation des spermatozoïdes lors du transit dans l'épididyme. Cet article est en cours d'écriture par Eric Pailhoux et devrait être soumis fin mai 2022, pour un numéro spécial de Genes (MDPI) « Male infertility : from genes to genomes ».

### 2. The differentiation of male germ cells and their epigenetic reprogramming during fetal testicular development in cattle is unique in ruminants.

### **3. DMRT1 is required for Testis Determination in Rabbits.**

Emilie Dujardin, Namya Mellouk, Béatrice Mandon-Pépin, Aurélie Dewaele, Marjolaine André, Dominique Thépot, Geneviève Jolivet, Eric Pailhoux, Maëlle Pannetier

Cet article ne prendra en compte qu'un aspect de la thèse d'Emilie Dujardin, afin de transmettre rapidement le message principal : DMRT1 est nécessaire à SRY pour exercer ses fonctions de déterminant testiculaire chez les mammifères. Grâce à notre modèle lapin, nous démontrons en effet pour la première fois cette hypothèse qui a longtemps été pressentie chez l'humain. Ce message très fort a été accueilli avec enthousiasme par la communauté scientifique de la détermination du sexe (présentation au [First Virtual International Symposium on Vertebrate Sex Determination](#), 2021) et pourra être soumis à un journal de haute renommée. Cet article est en cours de préparation avec Emilie.

### **4. Single-cell RNA Transcriptome Atlas of the Developing Fetal Rabbit Ovary.**

Namya Mellouk, Béatrice Mandon-Pépin, Aurélie Dewaele, Luc Jouneau, Émilie Dujardin, Anne Aubert-Frambourg, Dominique Thépot, Geneviève Jolivet, Éric Pailhoux, Maëlle Pannetier.

Cet article constituera pour notre équipe un premier pas dans le domaine très actuel des analyses transcriptomiques sur cellules individuelles. Nous pourrons ainsi décrire les différentes sous-populations cellulaires composant un ovaire fœtal avant l'entrée en méiose des cellules germinales chez un mammifère non murin. Des données sont déjà disponibles chez l'humain et permettront une analyse comparative entre modèles, définissant ainsi les similitudes ou les limites du lapin en tant que modèle pour l'humain. La valorisation de ce travail est d'autant plus importante que cet article constituera le premier article de Namya Mellouk comme première auteure depuis son recrutement comme chargée de recherche dans l'équipe. Néanmoins, les problèmes d'annotations du génome de lapin ralentissent les analyses. Je n'ai actuellement aucune visibilité sur les délais nécessaires avant la finalisation des analyses et l'écriture d'un papier. Je crains de ne pas voir l'aboutissement de ce projet dans lequel je me suis beaucoup investie pour permettre à l'équipe de développer ce type d'outil, et de perdre finalement ma place de dernière auteure.

D'autres articles seront par la suite à envisager dans la continuité des travaux de la thèse d'Emilie Dujardin (cibles de DMRT1 dans le testicule et paysages épigénétiques), du programme GERMIMÂLE (dynamique du transcriptome et du méthylome au cours de la spermatogénèse chez le bouc) et du travail de Namya Mellouk sur le rôle de DMRT1 dans les cellules germinales femelles.

## II. PROGRAMMES ANR DEBUTANTS

---

Deux projets ANR sont en cours.

ARDIGERM a débuté il y a 1 an et demi ; MEMORI vient tout juste d'être signé.

### 1. ANR ARDIGERM - Retinoic acid for germ cell differentiation and meiosis (Nov. 2020 – Nov.2024)

Coordinatrice officielle pour l'équipe DGP depuis 2020.

Transmission pour la suite au responsable officiel, Eric Pailhoux

Le but de ce projet ANR porté par Norbert Ghyslinck (IGBMC, Strasbourg) est de déterminer le rôle de l'acide rétinoïque sur les cellules germinales, en fonction du sexe, des stades de développement et des espèces animales considérées. Ainsi, notre équipe s'intéresse au rôle de l'acide rétinoïque (ATRA, All Trans Retinoic Acid) dans la différenciation des lignées germinales femelle et mâle chez le lapin. Cette problématique repose sur l'utilisation d'une lignée de lapin transgénique permettant de suivre la signalisation de l'ATRA grâce à un traceur fluorescent (lapins RARE-GFP) afin d'isoler les cellules germinales qui y répondent. Il s'agissait dans un premier temps de caractériser les cellules répondant à l'ATRA (cellules germinales uniquement ?) et de mettre en place du tri cellulaire pour purifier les cellules GFP+ à différents stades de développement afin de suivre l'effet de l'ATRA dans les processus de différenciation. Cet aspect a été pris en charge par Aurélie Dewaele (AI dans l'équipe) pour l'ovaire fœtal. Pour le mâle, la signalisation ATRA est importante dans le testicule après la naissance pour la différenciation des spermatogonies. Afin de déterminer la cinétique de sensibilité à l'ATRA en regard des processus de différenciation des cellules germinales mâles, j'ai recruté cette année une étudiante de master 2, Iris Barka. Iris montre notamment qu'il existe une concomitance entre l'activation de la signalisation ATRA et la détection de la reméthylation du génome des cellules germinales XY. L'essentiel de l'étude chez les mâles aurait dû être inclus dans le projet de thèse intitulé : Acide rétinoïque, Epigénétique et Différenciation de la lignée germinale mâle chez le lapin. J'avais obtenu une demi-bourse de thèse auprès du département PHASE d'INRAE (complément de la demi-bourse prévue dans l'ANR) et Iris aurait été la parfaite candidate. Néanmoins, en raison de mon départ en disponibilité, l'équipe a choisi de ne pas prendre de nouveau doctorant en septembre 2022 et de renoncer à cette bourse de thèse. L'étude du rôle de l'ATRA dans les cellules germinales mâles se limitera selon toute vraisemblance à l'analyse descriptive réalisée par Iris au cours de son stage de master. Chez la femelle, le transcriptome des cellules germinales (GFP+) triées à deux stades du développement fœtal (24 et 28 jpc) sera analysé et son contenu sera comparé à celui des différentes populations et sous-populations déterminée par les analyses single-cell RNAseq réalisées aux mêmes stades (projet CAROT, pages 65-67).

## **2. ANR MEMORI - Maternal Exposure to Mixed Organics pollutants: placental epigenetic marks and Risk assessment for offspring's health - (janvier 2022 – janvier 2026)**

**Ecriture du projet, Responsable de tâche et Coordinatrice pour l'équipe DGP**

**Transmission du leadership à Namya Mellouk**

Le but de ce projet porté par Anne Tarrade (INRAE BREED, Equipe PEPPS), est de déterminer l'effet d'une exposition maternelle à un mélange de perturbateurs (phénols et phtalates) sur la santé des descendants et de rechercher des biomarqueurs prédictifs notamment au niveau du placenta (modèles humain et lapin). Le cocktail de perturbateurs utilisé chez le lapin, sera basé sur les résultats d'une cohorte mère/enfant (cohorte SEPAGES) analysée par le deuxième partenaire de l'ANR (IAB, INSERM, La Tronche). Les doses à administrer aux lapines pour obtenir une exposition équivalente à ce qui aura été montré dans la cohorte humaine seront évaluées et déterminées par le partenaire 3 (Unité TOXALIM, INRAE, Toulouse). Notre équipe va s'intéresser aux effets d'une telle exposition maternelle (périconceptionnelle et gestationnelle) sur les gonades fœtales et postnatales de lapin, en se concentrant sur deux stades : i) la fin de la période fœtale (28 jpc) qui correspond à l'initiation de la différenciation des lignées germinales femelles et mâles ; et ii) le stade adulte, qui nous permettra d'évaluer les effets d'une telle exposition sur la santé reproductive des lapins. En plus d'approches classiques d'analyses histologiques et de dosage stéroïdiens, de nombreuses données omiques seront générées sur les gonades fœtales afin de s'intéresser aux ARNm (RNA-seq) et aux petits ARN non codants (small non coding RNA-seq), ainsi qu'à l'état épigénétique des cellules gonadiques en fonction de l'exposition maternelle (CUT&TAG pour analyser différentes marques d'histones associées aux enhancers). Un important travail d'intégration des données au niveau bioinformatique sera nécessaire afin de déterminer les voies dérégulées et le mode d'action de ces perturbateurs (action sur la chromatine ? via l'expression de miRNA ?). A l'âge adulte, en plus des approches classiques (histologie, immunohistologie, dosage de stéroïdes et d'AMH pour les femelles), la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes et leur contenu en petits ARN non codants seront évalués en collaboration avec l'équipe MECP2. Ce projet a été pensé en fonction du recrutement d'une nouvelle CR devant développer une thématique sur l'épigénétique des cellules germinales. C'est avec l'accord de Namya que j'ai écrit ce projet lors de la phase 2 du processus de soumission des projets ANR en février 2021. Il semblait donc logique de lui transmettre la direction de cette tâche. Selon le calendrier prévu, les premières expositions/gestations ne débuteront qu'à partir du printemps/été 2023.

---

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- Ahn, J., Heo, S., Lee, J., and Bang, D. (2021). Introduction to Single-Cell DNA Methylation Profiling Methods. *Biomolecules* *11*, 1013. <https://doi.org/10.3390/biom11071013>.
- Allais-Bonnet, A., and Pailhoux, E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Front. Cell Dev. Biol.* *2*, 56. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00056>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/ng1919>.
- Bartels, I., Pütz, I., Reintjes, N., Netzer, C., and Shoukier, M. (2013). Normal intelligence and premature ovarian failure in an adult female with a 7.6 Mb de novo terminal deletion of chromosome 9p. *Eur. J. Med. Genet.* *56*, 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2013.06.002>.
- Benetti, R., García-Cao, M., and Blasco, M.A. (2007). Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat. Genet.* *39*, 243–250. <https://doi.org/10.1038/ng1952>.
- Bennett, C.P., Docherty, Z., Robb, S.A., Ramani, P., Hawkins, J.R., and Grant, D. (1993). Deletion 9p and sex reversal. *J. Med. Genet.* *30*, 518–520. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.6.518>.
- Boulanger, L., Kocer, A., Daniel, N., Pannetier, M., Chesné, P., Heyman, Y., Renault, L., Mandon-Pépin, B., Chavatte-Palmer, P., Vignon, X., et al. (2008). Attempt to rescue sex-reversal by transgenic expression of the PISRT1 gene in XX PIS-/- goats. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* *2*, 142–151. <https://doi.org/10.1159/000143432>.
- Boulanger, L., Pannetier, M., Gall, L., Allais-Bonnet, A., Elzaïat, M., Le Bourhis, D., Daniel, N., Richard, C., Cotinot, C., Ghyselincq, N.B., et al. (2014). FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr. Biol. CB* *24*, 404–408. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.039>.
- Bowles, J., Cooper, L., Berkman, J., and Koopman, P. (1999). Sry requires a CAG repeat domain for male sex determination in *Mus musculus*. *Nat. Genet.* *22*, 405–408. <https://doi.org/10.1038/11981>.
- Bullejos, M., and Koopman, P. (2001). Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *221*, 201–205. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1134>.
- Busada, J.T., Velte, E.K., Serra, N., Cook, K., Niedenberger, B.A., Willis, W.D., Goulding, E.H., Eddy, E.M., and Geyer, C.B. (2016). RhoX13 is required for a quantitatively normal first wave of spermatogenesis in mice. *Reprod. Camb. Engl.* *152*, 379–388. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0268>.
- Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.-C. (2008). Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1264–1277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn016>.
- Clépet, C., Schafer, A.J., Sinclair, A.H., Palmer, M.S., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1993). The human SRY transcript. *Hum. Mol. Genet.* *2*, 2007–2012. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.12.2007>.
- Cocquet, J., De Baere, E., Gareil, M., Pannetier, M., Xia, X., Fellous, M., and Veitia, R.A. (2003). Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. *Cytogenet. Genome Res.* *101*, 206–211. <https://doi.org/10.1159/000074338>.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., et al. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* *27*, 159–166. <https://doi.org/10.1038/84781>.

- Daneau, I., Houde, A., Ethier, J.F., Lussier, J.G., and Silversides, D.W. (1995). Bovine SRY gene locus: cloning and testicular expression. *Biol. Reprod.* *52*, 591–599. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.3.591>.
- Daniel-Carlier, N., Harscoët, E., Thépot, D., Auguste, A., Pailhoux, E., and Jolivet, G. (2013). Gonad differentiation in the rabbit: evidence of species-specific features. *PLoS One* *8*, e60451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060451>.
- DeFalco, T., and Capel, B. (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *25*, 457–482. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.13350>.
- DeFalco, T., Potter, S.J., Williams, A.V., Waller, B., Kan, M.J., and Capel, B. (2015). Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell Rep.* *12*, 1107–1119. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.015>.
- Delaval, K., and Feil, R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *14*, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.01.005>.
- Delaval, K., Govin, J., Cerqueira, F., Rousseaux, S., Khochbin, S., and Feil, R. (2007). Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO J.* *26*, 720–729. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601513>.
- D'haene, B., Attanasio, C., Beysen, D., Dostie, J., Lemire, E., Bouchard, P., Field, M., Jones, K., Lorenz, B., Menten, B., et al. (2009). Disease-causing 7.4 kb cis-regulatory deletion disrupting conserved non-coding sequences and their interaction with the FOXL2 promotor: implications for mutation screening. *PLoS Genet.* *5*, e1000522. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000522>.
- Díaz-Hernández, V., León del Río, A., Zamora, M., and Merchant-Larios, H. (2008). Expression profiles of SRY and SOX9 in rabbit gonads: the classical model of mammalian sex differentiation. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* *2*, 152–166. <https://doi.org/10.1159/000143433>.
- Donohoe, D.R., and Bultman, S.J. (2012). Metaboloepigenetics: interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *J. Cell. Physiol.* *227*, 3169–3177. <https://doi.org/10.1002/jcp.24054>.
- Elzaiat, M., Jouneau, L., Thépot, D., Klopp, C., Allais-Bonnet, A., Cabau, C., André, M., Chaffaux, S., Crihiu, E.-P., Pailhoux, E., et al. (2014). High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats. *Biol. Reprod.* *91*, 153. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.122796>.
- Escudeiro, A., Adegas, F., Robinson, T.J., Heslop-Harrison, J.S., and Chaves, R. (2019). Conservation, Divergence, and Functions of Centromeric Satellite DNA Families in the Bovidae. *Genome Biol. Evol.* *11*, 1152–1165. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz061>.
- Fahrioglu, U., Murphy, M.W., Zarkower, D., and Bardwell, V.J. (2007). mRNA expression analysis and the molecular basis of neonatal testis defects in Dmrt1 mutant mice. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* *1*, 42–58. <https://doi.org/10.1159/000096238>.
- Fal, K., Tomkova, D., Vachon, G., Chabouté, M.-E., Berr, A., and Carles, C.C. (2021). Chromatin Manipulation and Editing: Challenges, New Technologies and Their Use in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, E512. <https://doi.org/10.3390/ijms22020512>.
- Feng, C.-W., Burnet, G., Spiller, C.M., Cheung, F.K.M., Chawengsaksophak, K., Koopman, P., and Bowles, J. (2021). Identification of regulatory elements required for Stra8 expression in fetal ovarian germ cells of the mouse. *Dev. Camb. Engl.* *148*, dev194977. <https://doi.org/10.1242/dev.194977>.

- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10604–10609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500398102>.
- Garcia-Moreno, S.A., Futtner, C.R., Salamone, I.M., Gonen, N., Lovell-Badge, R., and Maatouk, D.M. (2019). Gonadal supporting cells acquire sex-specific chromatin landscapes during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* *446*, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.12.023>.
- Garcia-Ortiz, J.E., Pelosi, E., Omari, S., Nedorezov, T., Piao, Y., Karmazin, J., Uda, M., Cao, A., Cole, S.W., Forabosco, A., et al. (2009). Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Dev. Biol.* *9*, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-36>.
- George, F.W., and Wilson, J.D. (1978). Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *47*, 550–555. <https://doi.org/10.1210/jcem-47-3-550>.
- Georges, A., L'Hôte, D., Todeschini, A.L., Auguste, A., Legois, B., Zider, A., and Veitia, R.A. (2014). The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *ELife* *3*. <https://doi.org/10.7554/eLife.04207>.
- Gjaltema, R.A.F., and Rots, M.G. (2020). Advances of epigenetic editing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *57*, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.020>.
- Gobé, C., Elzaïat, M., Meunier, N., André, M., Sellem, E., Congar, P., Jouneau, L., Allais-Bonnet, A., Naciri, I., Passet, B., et al. (2019). Dual role of DMXL2 in olfactory information transmission and the first wave of spermatogenesis. *PLoS Genet.* *15*, e1007909. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007909>.
- Gondos, B., George, F.W., and Wilson, J.D. (1983). Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. *Biol. Reprod.* *29*, 791–798. <https://doi.org/10.1095/biolreprod29.3.791>.
- 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*, e1006520. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006520>.
- Gonen, N., Futtner, C.R., Wood, S., Garcia-Moreno, S.A., 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* *360*, 1469–1473. <https://doi.org/10.1126/science.aas9408>.
- Govoroun, M.S., Pannetier, M., Pailhoux, E., Cocquet, J., Brillard, J.-P., Couty, I., Batellier, F., and Cotinot, C. (2004). Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *231*, 859–870. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20189>.
- Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., Mcmeel, O.M., Martin, S.A., and Fostier, A. (1999). Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* *54*, 154–162. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199910\)54:2<154::AID-MRD7>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199910)54:2<154::AID-MRD7>3.0.CO;2-5).
- Heessen, S., and Fornerod, M. (2007). The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep.* *8*, 914–919. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401075>.
- Hilton, I.B., D'Ippolito, A.M., Vockley, C.M., Thakore, P.I., Crawford, G.E., Reddy, T.E., and Gersbach, C.A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* *33*, 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>.

Ioannidis, J., Taylor, G., Zhao, D., Liu, L., Idoko-Akoh, A., Gong, D., Lovell-Badge, R., Guioli, S., McGrew, M.J., and Clinton, M. (2021). Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *118*, e2020909118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020909118>.

Iwafuchi-Doi, M. (2019). The mechanistic basis for chromatin regulation by pioneer transcription factors. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* *11*, e1427. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1427>.

Jameson, S.A., Natarajan, A., Cool, J., DeFalco, T., Maatouk, D.M., Mork, L., Munger, S.C., and Capel, B. (2012). Temporal transcriptional profiling of somatic and germ cells reveals biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse gonad. *PLoS Genet.* *8*, e1002575. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002575>.

Jolivet, G., Daniel-Carlier, N., Harscoët, E., Airaud, E., Dewaele, A., Pierson, C., Giton, F., Boulanger, L., Daniel, N., Mandon-Pépin, B., et al. (2022). Fetal Estrogens are not Involved in Sex Determination But Critical for Early Ovarian Differentiation in Rabbits. *Endocrinology* *163*, bqab210. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab210>.

Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M., and Sasaki, H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 2272–2280. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm179>.

Kaya-Okur, H.S., Wu, S.J., Codomo, C.A., Pledger, E.S., Bryson, T.D., Henikoff, J.G., Ahmad, K., and Henikoff, S. (2019). CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. *Nat. Commun.* *10*, 1930. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09982-5>.

Kim, H.S., Tan, Y., Ma, W., Merkurjev, D., Destici, E., Ma, Q., Suter, T., Ohgi, K., Skowronska-Krawczyk, D., Friedman, M., et al. (2018). Pluripotency Factors Functionally Premark Cell-Type-Restricted Enhancers in ESCs. *Nature* *556*, 510–514. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0048-8>.

King, H.W., and Klose, R.J. (2017). The pioneer factor OCT4 requires the chromatin remodeller BRG1 to support gene regulatory element function in mouse embryonic stem cells. *ELife* *6*, e22631. <https://doi.org/10.7554/eLife.22631>.

Knarston, I.M., Pachernegg, S., Robevska, G., Ghobrial, I., Er, P.X., Georges, E., Takasato, M., Combes, A.N., Jørgensen, A., Little, M.H., et al. (2020). An In Vitro Differentiation Protocol for Human Embryonic Bipotential Gonad and Testis Cell Development. *Stem Cell Rep.* *15*, 1377–1391. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.10.009>.

Krentz, A.D., Murphy, M.W., Kim, S., Cook, M.S., Capel, B., Zhu, R., Matin, A., Sarver, A.L., Parker, K.L., Griswold, M.D., et al. (2009). The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 22323–22328. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905431106>.

Krentz, A.D., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2011). DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of *Stra8* in the mammalian fetal ovary. *Dev. Biol.* *356*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.658>.

Le Rolle, M., Massa, F., Siggers, P., Turchi, L., Loubat, A., Koo, B.-K., Clevers, H., Greenfield, A., Schedl, A., Chaboissier, M.-C., et al. (2021). Arrest of WNT/ $\beta$ -catenin signaling enables the transition from pluripotent to differentiated germ cells in mouse ovaries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *118*, e2023376118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023376118>.

Ledig, S., Hiort, O., Wünsch, L., and Wieacker, P. (2012). Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *Eur. J. Endocrinol.* *167*, 119–124. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0136>.

- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A.H.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., and Peters, A.H.F.M. (2003). Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Curr. Biol.* *13*, 1192–1200. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00432-9).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.055>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.034>.
- Lindeman, R.E., Murphy, M.W., Agrimson, K.S., Gewiss, R.L., Bardwell, V.J., Gearhart, M.D., and Zarkower, D. (2021). The conserved sex regulator DMRT1 recruits SOX9 in sexual cell fate reprogramming. *Nucleic Acids Res.* *49*, 6144–6164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab448>.
- Liu, C., Rodriguez, K.F., Brown, P.R., and Yao, H.H.-C. (2018). Reproductive, Physiological, and Molecular Outcomes in Female Mice Deficient in Dhh and Ihh. *Endocrinology* *159*, 2563–2575. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00095>.
- Lovell-Badge, R., Canning, C., and Sekido, R. (2002). Sex-determining genes in mice: building pathways. *Novartis Found. Symp.* *244*, 4–18; discussion 18-22, 35–42, 253–257. .
- Ma, L., O’Connell, J.R., VanRaden, P.M., Shen, B., Padhi, A., Sun, C., Bickhart, D.M., Cole, J.B., Null, D.J., Liu, G.E., et al. (2015). Cattle Sex-Specific Recombination and Genetic Control from a Large Pedigree Analysis. *PLoS Genet.* *11*, e1005387. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005387>.
- Macaya, G., Cortadas, J., and Bernardi, G. (1978). An analysis of the bovine genome by density-gradient centrifugation. Preparation of the dG+dC-rich DNA components. *Eur. J. Biochem.* *84*, 179–188. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12155.x>.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Griswold, M.D., Yoshida, S., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2010). The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *Dev. Cell* *19*, 612–624. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.010>.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* *476*, 101–104. <https://doi.org/10.1038/nature10239>.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., et al. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* *417*, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature751>.
- Mauleon, P., Bezaud, J., and Terqui, M. (1977). Very early and transient 17  $\beta$ -estradiol secretion by fetal sheep ovary. In vitro study. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* *17*, 399–401. <https://doi.org/10.1051/rnd:19770315>.
- McElreavey, K., Vilain, E., Abbas, N., Herskowitz, I., and Fellous, M. (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3368–3372. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3368>.
- Milewich, L., George, F.W., and Wilson, J.D. (1977). Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. *Endocrinology* *100*, 187–196. <https://doi.org/10.1210/endo-100-1-187>.

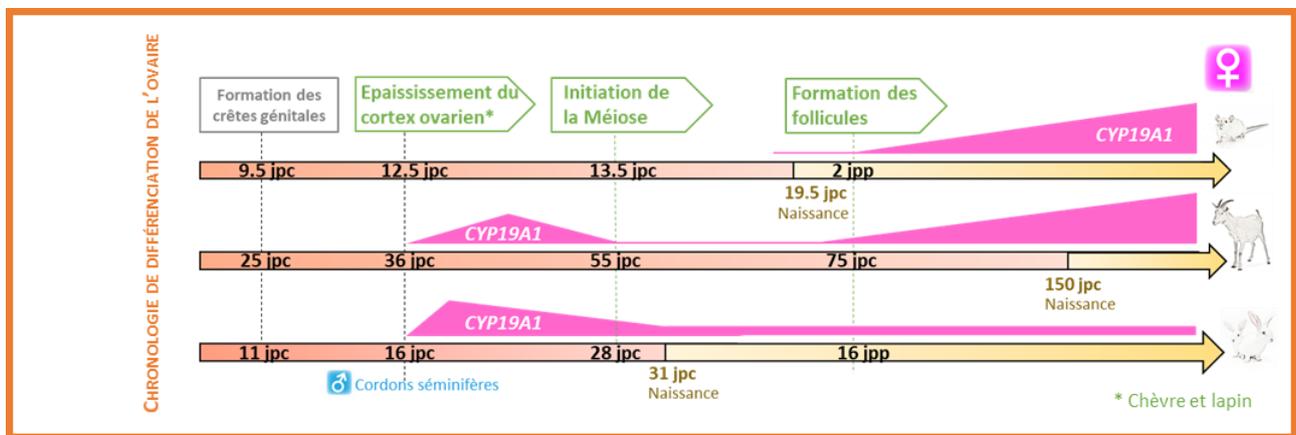
- Montazer-Torbati, F., Kocer, A., Auguste, A., Renault, L., Charpigny, G., Pailhoux, E., and Pannetier, M. (2010). A study of goat SRY protein expression suggests putative new roles for this gene in the developing testis of a species with long-lasting SRY expression. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 3324–3335. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22452>.
- Murphy, M.W., Lee, J.K., Rojo, S., Gearhart, M.D., Kurahashi, K., Banerjee, S., Loeuille, G.-A., Bashamboo, A., McElreavey, K., Zarkower, D., et al. (2015). An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 442–451. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3032>.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., et al. (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11778–11783. <https://doi.org/10.1073/pnas.182314699>.
- Nicol, B., Grimm, S.A., Gruzdev, A., Scott, G.J., Ray, M.K., and Yao, H.H.-C. (2018a). Genome-wide identification of FOXL2 binding and characterization of FOXL2 feminizing action in the fetal gonads. *Hum. Mol. Genet.* 27, 4273–4287. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy312>.
- Nicol, B., Grimm, S.A., Gruzdev, A., Scott, G.J., Ray, M.K., and Yao, H.H.-C. (2018b). Genome-wide identification of FOXL2 binding and characterization of FOXL2 feminizing action in the fetal gonads. *Hum. Mol. Genet.* 27, 4273–4287. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy312>.
- Niu, W., and Spradling, A.C. (2020). Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 20015–20026. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005570117>.
- Nuñez, J.K., Chen, J., Pommier, G.C., Cogan, J.Z., Replogle, J.M., Adriaens, C., Ramadoss, G.N., Shi, Q., Hung, K.L., Samelson, A.J., et al. (2021). Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell* 184, 2503-2519.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.025>.
- Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Serval, N., Taourit, S., Furet, J.P., Fellous, M., Grosclaude, F., Cribiu, E.P., Cotinot, C., et al. (2001). A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat. Genet.* 29, 453–458. <https://doi.org/10.1038/ng769>.
- 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. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 224, 39–50. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10083>.
- Pannetier, M., Serval, N., Cocquet, J., Besnard, N., Cotinot, C., and Pailhoux, E. (2003). Expression studies of the PIS-regulated genes suggest different mechanisms of sex determination within mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 101, 199–205. <https://doi.org/10.1159/000074337>.
- Pannetier, M., Renault, L., Jolivet, G., Cotinot, C., and Pailhoux, E. (2005). Ovarian-specific expression of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by a FOXL2 bidirectional promoter. *Genomics* 85, 715–726. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.02.011>.
- Pannetier, M., Fabre, S., Batista, F., Kocer, A., Renault, L., Jolivet, G., Mandon-Pépin, B., Cotinot, C., Veitia, R., and Pailhoux, E. (2006a). FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 399–413. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01947>.
- Pannetier, M., Tilly, G., Kocer, A., Hudrisier, M., Renault, L., Chesnais, N., Costa, J., Le Provost, F., Vaiman, D., Vilotte, J.-L., et al. (2006b). Goat SRY induces testis development in XX transgenic mice. *FEBS Lett.* 580, 3715–3720. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.060>.

- Pannetier, M., Julien, E., Schotta, G., Tardat, M., Sardet, C., Jenuwein, T., and Feil, R. (2008). PR-SET7 and SUV4-20H regulate H4 lysine-20 methylation at imprinting control regions in the mouse. *EMBO Rep.* *9*, 998–1005. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.147>.
- Pannetier, M., Elzaïat, M., Thépot, D., and Pailhoux, E. (2012). Telling the story of XX sex reversal in the goat: highlighting the sex-crossroad in domestic mammals. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* *6*, 33–45. <https://doi.org/10.1159/000334056>.
- Payen, E., Pailhoux, E., Merhi, R.A., Gianquinto, L., Kirszenbaum, M., Locatelli, A., and Cotinot, C. (2002). Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* *40*, 567–575. <https://doi.org/10.1387/ijdb.8840189>.
- Perrier, J.-P., Sellem, E., Prézélin, A., Gasselín, M., Jouneau, L., Piumi, F., Al Adhami, H., Weber, M., Fritz, S., Boichard, D., et al. (2018). A multi-scale analysis of bull sperm methylome revealed both species peculiarities and conserved tissue-specific features. *BMC Genomics* *19*, 404. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4764-0>.
- Planells, B., Gómez-Redondo, I., Sánchez, J.M., McDonald, M., Cánovas, Á., Lonergan, P., and Gutiérrez-Adán, A. (2020). Gene expression profiles of bovine genital ridges during sex determination and early differentiation of the gonadst. *Biol. Reprod.* *102*, 38–52. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz170>.
- Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Muskhelishvili, L., Rusyn, I., and Ross, S.A. (2007). Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J. Nutr.* *137*, 216S–222S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.1.216S>.
- Radford, E.J., Ito, M., Shi, H., Corish, J.A., Yamazawa, K., Isganaitis, E., Seisenberger, S., Hore, T.A., Reik, W., Erkek, S., et al. (2014). In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science* *345*, 1255903. <https://doi.org/10.1126/science.1255903>.
- Rahman, M.M., and Tollefsbol, T.O. (2021). Targeting cancer epigenetics with CRISPR-dCAS9: Principles and prospects. *Methods San Diego Calif* *187*, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.04.006>.
- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.834100>.
- Ross, D.G.F., Bowles, J., Hope, M., Lehnert, S., and Koopman, P. (2009). Profiles of gonadal gene expression in the developing bovine embryo. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* *3*, 273–283. <https://doi.org/10.1159/000252791>.
- 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. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 933–942. <https://doi.org/10.1242/dev.00969>.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* *18*, 1251–1262. <https://doi.org/10.1101/gad.300704>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.001>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature06944>.

- Selma, S., and Orzáez, D. (2021). Perspectives for epigenetic editing in crops. *Transgenic Res.* 30, 381–400. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00252-z>.
- Sethi, N., Yan, Y., Quek, D., Schupbach, T., and Kang, Y. (2010). Rabconnectin-3 is a functional regulator of mammalian Notch signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 34757–34764. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158634>.
- Simon, R., Lischer, H.E.L., Pieńkowska-Schelling, A., Keller, I., Häfliger, I.M., Letko, A., Schelling, C., Lühken, G., and Drögemüller, C. (2020). New genomic features of the polled intersex syndrome variant in goats unraveled by long-read whole-genome sequencing. *Anim. Genet.* 51, 439–448. <https://doi.org/10.1111/age.12918>.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–244. <https://doi.org/10.1038/346240a0>.
- Smallwood, S.A., and Kelsey, G. (2012). De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet.* 28, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004>.
- Smith, C.A., Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., and Sinclair, A.H. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461, 267–271. <https://doi.org/10.1038/nature08298>.
- Soto, D.A., and Ross, P.J. (2021). Similarities between bovine and human germline development revealed by single-cell RNA sequencing. *Reproduction* 161, 239–253. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0313>.
- Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L.-L., and Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>.
- Syding, L.A., Nickl, P., Kasperek, P., and Sedlacek, R. (2020). CRISPR/Cas9 Epigenome Editing Potential for Rare Imprinting Diseases: A Review. *Cells* 9, E993. <https://doi.org/10.3390/cells9040993>.
- Tsuji-Hosokawa, A., Ogawa, Y., Tsuchiya, I., Terao, M., and Takada, S. (2022). Human SRY Expression at the Sex-determining Period is Insufficient to Drive Testis Development in Mice. *Endocrinology* 163, bqab217. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab217>.
- 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. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh124>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>.
- Umlauf, D., Goto, Y., Cao, R., Cerqueira, F., Wagschal, A., Zhang, Y., and Feil, R. (2004). Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat. Genet.* 36, 1296–1300. <https://doi.org/10.1038/ng1467>.
- Vaillant, S., Dorizzi, M., Pieau, C., and Richard-Mercier, N. (2001). Sex reversal and aromatase in chicken. *J. Exp. Zool.* 290, 727–740. <https://doi.org/10.1002/jez.1123>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/17068>.

- Veitia, R., Nunes, M., Brauner, R., Doco-Fenzy, M., Joanny-Flinois, O., Jaubert, F., Lortat-Jacob, S., Fellous, M., and McElreavey, K. (1997). Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics* *41*, 271–274. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4648>.
- Vernet, N., Dennefeld, C., Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., Ghyselinck, N.B., and Mark, M. (2006). Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* *147*, 96–110. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0953>.
- Vidal, V.P., Chaboissier, M.C., de Rooij, D.G., and Schedl, A. (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* *28*, 216–217. <https://doi.org/10.1038/90046>.
- Wei, W., Pelechano, V., Järvelin, A.I., and Steinmetz, L.M. (2011). Functional consequences of bidirectional promoters. *Trends Genet. TIG* *27*, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.04.002>.
- Yamagata, K., Yamazaki, T., Miki, H., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., and Baba, T. (2007). Centromeric DNA hypomethylation as an epigenetic signature discriminates between germ and somatic cell lineages. *Dev. Biol.* *312*, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.041>.
- Yan, Y., Deneff, N., and Schüpbach, T. (2009). The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for notch signaling and endosomal trafficking in *Drosophila*. *Dev. Cell* *17*, 387–402. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.07.001>.
- Yoshimoto, S., Ikeda, N., Izutsu, Y., Shiba, T., Takamatsu, N., and Ito, M. (2010). Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 2519–2526. <https://doi.org/10.1242/dev.048751>.
- Yoshino, T., Suzuki, T., Nagamatsu, G., Yabukami, H., Ikegaya, M., Kishima, M., Kita, H., Imamura, T., Nakashima, K., Nishinakamura, R., et al. (2021). Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells. *Science* *373*, eabe0237. <https://doi.org/10.1126/science.abe0237>.
- Zaret, K.S. (2020). Pioneer Transcription Factors Initiating Gene Network Changes. *Annu. Rev. Genet.* *54*, 367–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-030220-015007>.
- Zaret, K.S., and Carroll, J.S. (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* *25*, 2227–2241. <https://doi.org/10.1101/gad.176826.111>.
- Zhang, S., Cao, X., Li, Y., Wang, K., Yuan, M., and Lan, X. (2020). Detection of polled intersex syndrome (PIS) and its effect on phenotypic traits in goats. *Anim. Biotechnol.* *31*, 561–565. <https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1625782>.
- Zhang, T., Oatley, J., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2016). DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment. *PLoS Genet.* *12*, e1006293. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006293>.
- Zhao, D., Liu, L., Nandi, S., Ioannidis, J., Yang, X., Gong, D., McGrew, M.J., and Clinton, M. (2022). Estrogen suppresses DMRT1 expression during ovarian development in the chicken. *2022.02.22.481469*. <https://doi.org/10.1101/2022.02.22.481469>.

## ANNEXE 1 – CHRONOLOGIE DE LA DIFFERENCIATION DE L'OVAIRE



...“Nobody can tell ya  
There's only one song worth singing  
They may try and sell ya  
'Cause it hangs them up  
To see someone like you

But you gotta make your own kind of music  
Sing your own special song  
Make your own kind of music  
Even if nobody else sings along..”

**Titre : Détermination du Sexe, Différenciation de la Lignée Germinale, Epigénétique et Fertilité**

**Mots clés :** Ovaire, testicule, cellules germinales, méthylation, lapin, souris, ruminants

**Résumé :** Chez les mammifères, la fertilité d'un individu ainsi que la transmission à sa descendance d'informations génétiques et épigénétiques de qualité, sont intimement liées au bon déroulement de la différenciation des gonades et en particulier de la lignée germinale. Dans les gonades, un dialogue harmonieux entre les cellules germinales et leurs cellules somatiques environnantes est indispensable et débute dès la vie fœtale après la détermination du sexe et l'initiation de la différenciation de l'ovaire ou du testicule.

Au cours de mes travaux et ceux des étudiantes que j'ai encadrées, je me suis intéressée aux cascades génétiques impliquées dans la détermination et la différenciation du testicule et de l'ovaire chez des animaux d'élevage. En parallèle, j'ai développé ces dernières années plusieurs projets sur les lignées germinales mâle et femelle ; en me concentrant, en particulier chez le mâle, sur la différenciation des cellules germinales et la reprogrammation de leur épigénome.

**Title : Sex Determination, Germ line Differentiation, Epigenetics and Fertility**

**Keywords :** Ovary, testis, germ cells, DNA methylation, rabbits, mice, ruminants

**Abstract :** In mammals, the fertility of an individual, as well as the transmission to its offspring of quality genetic and epigenetic information, are closely linked to the smooth running of the differentiation of the gonads and in particular of the germ line. In the gonads, a harmonious dialogue between germ cells and their surrounding somatic cells is essential and begins in fetal life after sex determination and the initiation of ovarian or testicular differentiation.

During my work and that of the students I supervised, I became interested in the genetic cascades involved in the determination and differentiation of the testicle and the ovary in farm animals. In parallel, I have developed in recent years several projects on male and female germ lines; focusing, particularly in the male, on the differentiation of germ cells and the reprogramming of their epigenome.