

# Régulation de la détermination du sexe et de la différenciation ovarienne : implications dans les variations du développement sexuel

*Aitana Perea-Gomez, Marie-Christine Chaboissier*

La détermination du sexe est le processus biologique par lequel un organisme à reproduction sexuée initie une différenciation de type femelle ou mâle. Les stratégies mises en œuvre par les différentes espèces animales pour la détermination du sexe sont très variées en ce qui concerne le type de contrôle (environnemental ou génétique), mais aussi les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans ce processus. Chez la plupart des mammifères, la détermination du sexe est contrôlée de façon génétique par la présence de chromosomes sexuels qui dictent le développement femelle (individus XX) ou mâle (individus XY).

Une des étapes clés du développement sexuel a lieu pendant la vie embryonnaire avec la formation et la différenciation des gonades. Avant la sixième semaine de gestation chez l'humain (équivalente au onzième jour de développement embryonnaire chez la souris), les gonades indifférenciées sont identiques chez les embryons des deux sexes. À la suite du processus de détermination sexuelle gonadique, des cascades génétiques distinctes aboutissent à la formation d'ovaires chez les embryons XX femelles et de testicules chez les embryons XY mâles. La fonction des ovaires et des testicules adultes est essentielle pour le maintien de l'espèce *via* la production de gamètes (ovocytes et spermatozoïdes), dont la fusion à la fécondation génère un zygote qui pourra former un nouvel individu. En outre, les gonades produisent des hormones qui contrôlent la mise en place du sexe anatomique avec la différenciation des organes génitaux internes et externes.

Les situations où le sexe chromosomique, gonadique ou anatomique sont atypiques sont regroupées sous le nom de troubles du développement sexuel (*disorders of sexual development*, DSD) ou de variations du développement sexuel (*differences in sex development*, DSD). Les DSD sont hétérogènes aussi bien dans leur présentation clinique que dans leur taux d'incidence ou leur cause. Déterminer les variants

génétiques à l'origine des DSD est important pour prédire l'évolution du patient et adapter sa prise en charge. Actuellement, un diagnostic moléculaire peut être posé dans moins de 50 % des cas de DSD. Afin d'améliorer ce taux et d'identifier de nouveaux variants à l'origine des DSD, il est essentiel d'étudier les réseaux génétiques qui contrôlent les différentes étapes du développement sexuel, et en particulier la formation et la différenciation des gonades.

En 1990, le gène SRY, porté par le chromosome Y, a été identifié comme le facteur initiateur de la détermination du destin testiculaire. Depuis, de nombreux travaux se sont attachés à identifier les réseaux génétiques en amont et en aval de la fonction de SRY impliqués dans la morphogénèse, la différenciation cellulaire et la production hormonale des testicules embryonnaires et adultes. En revanche, les réseaux génétiques impliqués dans la formation et la différenciation ovariennes ont été comparativement moins étudiés, et nos connaissances sur le développement sexuel femelle demeurent parcellaires. Le projet ANR SexDiff, présenté dans le cadre du colloque *Le Genre en recherche* du 15 décembre 2020, est un projet de recherche collaboratif dont l'objectif est d'augmenter notre connaissance des réseaux génétiques responsables de la formation et de la différenciation des ovaires de mammifère, et d'améliorer ainsi les outils de diagnostic des DSD.

## ► La détermination du sexe gonadique, une étape clé du développement sexuel des mammifères

### Les stratégies de détermination du sexe

La reproduction sexuée produit de nouveaux individus avec une information génétique nouvelle et unique à partir de la combinaison de l'information génétique de deux individus de sexe différent. Ce mode de reproduction, largement majoritaire dans le monde du vivant, offre des avantages adaptatifs. En produisant de la diversité génétique à chaque génération, de nouvelles combinaisons génétiques potentiellement critiques pour l'adaptation à de nouveaux environnements apparaissent, et des mutations délétères sont éliminées.

Les stratégies de détermination du sexe déployées par les espèces à reproduction sexuée pour générer des individus mâle et femelle sont très variées (Capel, 2017). Dans les cas de détermination du sexe environnementale, des facteurs externes tels que la température influencent le développement mâle ou femelle. Ainsi, chez de nombreuses espèces de reptiles, le développement mâle ou femelle des embryons dépend de la température d'incubation des œufs pendant une période critique. Dans certains cas comme chez la tortue *Trachemys scripta*, les températures élevées favorisent le développement femelle, alors qu'elles conduisent à la naissance de mâles chez l'alligator (*Alligator mississippiensis*). Pour les espèces dont la détermination du sexe est fortement dépendante de la température, le réchauffement climatique peut poser un problème majeur pour le maintien des sex-ratios dans les populations (Lockley et Eizaguirre, 2021).

Pour la grande majorité des mammifères, les chromosomes sexuels X et Y transmis au zygote au moment de la fécondation dictent le sexe génétique des individus : XX

femelle et XY mâle. D'autres types de chromosomes sexuels existent, en particulier chez certaines espèces d'oiseaux où les femelles portent un chromosome Z et un chromosome W (femelles hétérogamétiques ZW), alors que les mâles portent deux chromosomes Z (mâles homogamétiques ZZ). Par ailleurs, chez certaines espèces de poissons, la détermination du sexe est contrôlée par des facteurs génétiques, alors que des chromosomes sexuels distincts ne sont pas identifiés (Stöck *et al.*, 2021).

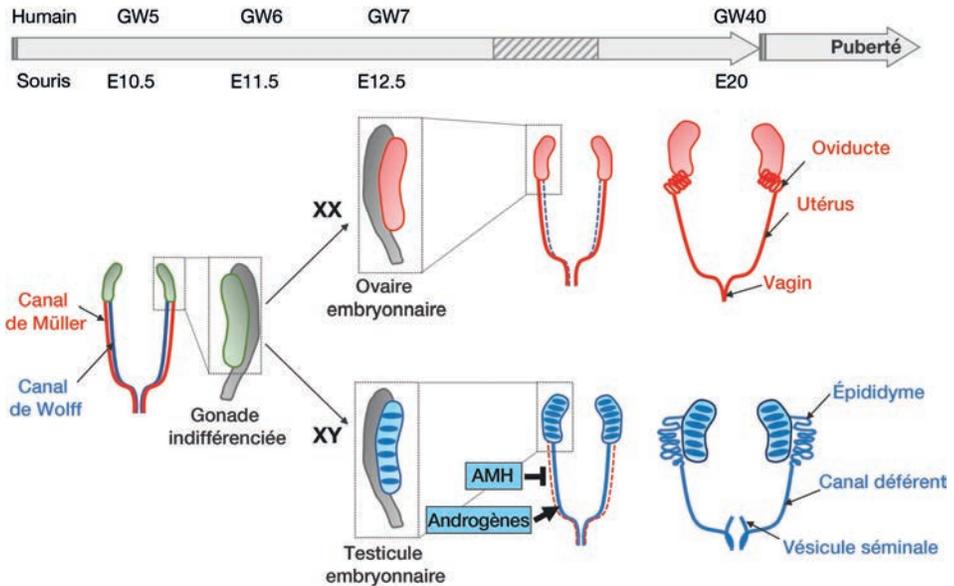
## L'importance du sexe gonadique

Bien que la détermination du sexe chromosomique soit établie dès la fécondation par l'apport d'un chromosome X ou Y, les embryons XX et XY sont morphologiquement identiques jusqu'à la cinquième semaine de gestation chez l'humain (*gestation week 5, GW5*) ou le dixième jour de développement embryonnaire chez la souris (*embryonic day 10.5, E10.5*). C'est à ce moment que le contenu chromosomique XX ou XY va influencer la détermination du sexe gonadique et l'acquisition d'une identité ovarienne ou testiculaire. Dès GW6 chez l'humain (E11.5 chez la souris), ovaires et testicules se différencient selon deux programmes génétiques spécifiques. D'une façon similaire, les ébauches des organes génitaux sont identiques dans les premières étapes de développement embryonnaire, avec notamment la présence de canaux de Wolff (précurseurs des structures mâles) et de canaux de Müller (précurseurs des structures femelles) dans les embryons des deux sexes. Ce n'est qu'à la suite de la détermination du sexe gonadique et de la formation d'ovaires ou de testicules que les organes génitaux internes (les trompes de Fallope, ou oviductes, l'utérus et le vagin chez les femelles, et l'épididyme, le canal déférent, la prostate et les vésicules séminales chez les mâles) et les organes génitaux externes (le clitoris et les lèvres chez la femelle, le pénis et le scrotum chez le mâle) se différencient en fonction du sexe (figure 7.1).

Le rôle majeur du sexe gonadique dans le contrôle du développement sexuel a été mis en évidence par les expériences pionnières réalisées par l'embryologiste Alfred Jost en 1947 (Josso, 2008). En mettant au point des techniques de microchirurgie *in utero*, Jost a réalisé des ablations des gonades (gonadectomies) d'embryons de lapin mâles ou femelles à différents moments de leur développement. L'ablation des ovaires n'a pas d'effet sur la formation du tractus génital : les foetus développent des organes génitaux internes et externes de type femelle. En revanche, l'ablation précoce des testicules se traduit par l'absence des dérivés masculins et le développement d'un tractus génital femelle. Ces travaux ont permis de montrer que :

- le développement d'organes génitaux femelles ne nécessite pas la présence d'un ovaire, alors que la formation des organes génitaux mâles est dépendante de substances produites par les testicules ;
- les hormones testiculaires sont requises pour soutenir le développement des structures mâles et éliminer les structures femelles initialement présentes dans les embryons des deux sexes.

Des travaux ultérieurs ont identifié la nature des hormones testiculaires mises en évidence par les expériences de Jost : la testostérone, nécessaire au maintien et au développement des structures mâles dérivées du canal de Wolff, et l'hormone anti-müllérienne (*anti-müllerian hormone, AMH*), qui contrôle la dégénérescence des organes génitaux femelles dérivés du canal de Müller (Josso, 2008 ; Zhao et Yao, 2019).



**Figure 7.1.** Différenciation du tractus génital mâle et femelle en réponse à l'action des hormones gonadiques.

La gonade indifférenciée identique dans les embryons des deux sexes se développe en ovaire ou en testicule en fonction du sexe chromosomique (XX ou XY). Les hormones testiculaires agissent sur les tissus précurseurs du tractus génital. Chez les embryons XY, les androgènes (dont la testostérone) sont nécessaires au maintien du canal de Wolff (précurseur des organes génitaux internes mâles), et l'hormone anti-müllérienne (AMH) provoque la dégénérescence du canal de Müller (précurseur des organes génitaux femelles). Chez les embryons XX, le canal de Wolff dégénère sans androgènes et le canal de Müller se développe en absence d'AMH.

Chez les embryons femelles, en absence de ces deux hormones, les structures mâles ne peuvent être maintenues faute de testostérone, et le tractus génital femelle se développe sans opposition de l'AMH.

## Les variations du développement sexuel

Des défauts dans la formation ou la fonction des gonades ou dans la production des hormones sexuelles peuvent se traduire par des altérations du développement sexuel. En cas de malformation des testicules ou de déficits dans la production d'hormones testiculaires, un enfant porteur de chromosomes sexuels XY peut présenter des organes génitaux internes et/ou externes féminins ou insuffisamment masculinisés. À l'inverse, un enfant porteur de chromosomes sexuels XX peut développer des organes génitaux virilisés sous l'action d'androgènes produits dans les cas d'hyperplasie congénitale des glandes surrénales.

Les DSD regroupent des situations très hétérogènes d'un point de vue clinique et étiologique, allant de la cryptorchidie (défaut dans la descente des testicules) aux malformations des gonades, qui peuvent se traduire par une discordance entre l'anatomie des organes génitaux et le sexe chromosomique (Lee *et al.*, 2006).

Les DSD peuvent être classées en trois groupes :

- les DSD touchant les chromosomes sexuels (présence d'un seul chromosome X, comme dans le syndrome de Turner 45,X, ou de deux chromosomes X et un chromosome Y, comme dans le syndrome de Klinefelter 47,XXY) ;
- les 46,XY DSD touchant des patients XY, qui présentent entre autres des défauts dans la formation des testicules ou dans la production ou l'action des androgènes ;
- les 46,XX DSD touchant des patients XX, qui présentent entre autres des défauts dans la formation des gonades ou un excès de production d'androgènes.

La prise en charge des patients DSD nécessite des équipes pluridisciplinaires qui évaluent le risque de survenue de tumeurs, qui constituerait une indication pour la chirurgie d'ablation des gonades, analysent l'impact sur la fertilité, anticipent les risques de comorbidité et optimisent la qualité de vie du patient et de son entourage. Le diagnostic moléculaire est un élément clé pour améliorer la prise en charge précoce des DSD. Au moins 75 gènes sont associés à la survenue de DSD. Néanmoins, et en dépit des apports des nouvelles techniques de séquençage à haut débit, les variants génétiques à l'origine des DSD ne sont pas identifiés dans plus de la moitié des patients (Délot et Vilain, 2021). L'étude approfondie des réseaux génétiques responsables de la formation, la différenciation et le fonctionnement des gonades est indispensable pour fournir de nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués dans les DSD.

## ►► Un seul organe embryonnaire, la gonade indifférenciée

### Formation des précurseurs des cellules testiculaires et ovariennes

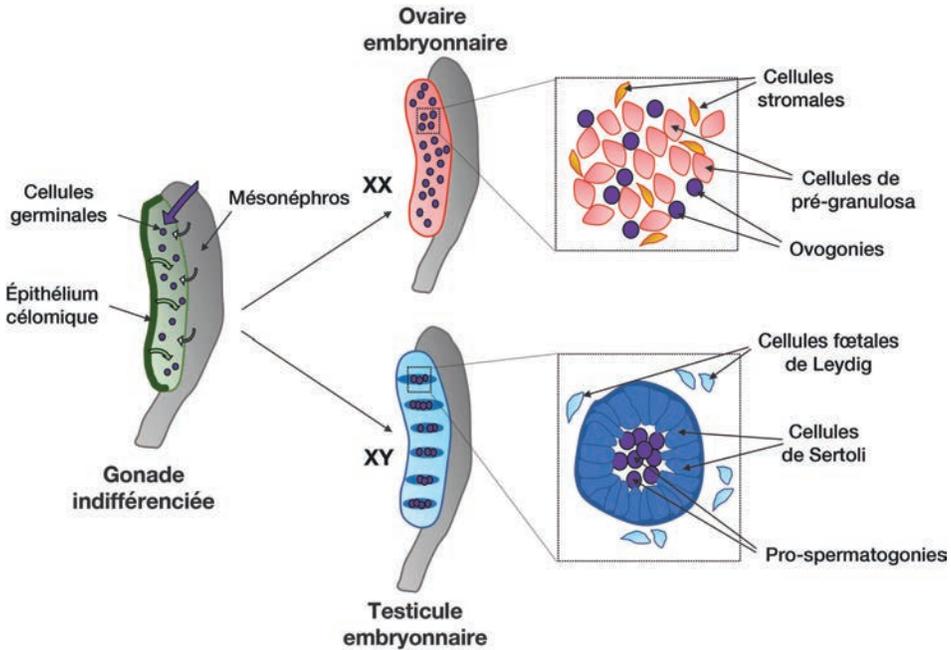
Outre son importance pour l'amélioration des outils de diagnostic moléculaire des DSD, l'étude du développement gonadique est un champ fascinant de la biologie du développement. Dans ce processus singulier, un organe primordial unique, la gonade indifférenciée, peut former deux organes distincts, l'ovaire ou le testicule, en fonction du réseau génétique qui y est activé (Nef *et al.*, 2019).

Malgré leurs morphologies très différentes, ovaires et testicules adultes sont formés par des types cellulaires équivalents remplissant des fonctions similaires dans les deux sexes. Les gamètes (ovocytes et spermatozoïdes) produits dans les ovaires et les testicules à partir de la puberté sont les seules cellules haploïdes de l'organisme, issues du processus de méiose et pouvant par la suite fusionner pour donner naissance à un nouvel organisme. La production et la survie des gamètes (ovogenèse et spermatogenèse) nécessitent des signaux moléculaires et un environnement cellulaire uniques fournis par les cellules de soutien : les cellules de la granulosa de l'ovaire et les cellules de Sertoli du testicule. Enfin, les gonades sont aussi des organes endocrines et contiennent des cellules productrices d'hormones stéroïdiennes, telles les cellules de la thèque de l'ovaire et les cellules de Leydig du testicule. Les cellules germinales (gamètes) et somatiques (cellules de soutien et cellules stéroïdiennes) des ovaires et des testicules adultes sont dérivées de cellules présentes dans les gonades embryonnaires spécifiées à partir des précurseurs de la gonade indifférenciée (Rotgers *et al.*, 2018).

La gonade indifférenciée apparaît aux alentours de GW5 chez l'humain (E10 chez la souris) comme un épaissement de la paroi cœlomique dans la région moyenne du corps, à proximité du mésonéphros, le rein embryonnaire transitoire (Nef *et al.*, 2019). Les cellules de l'épithélium cœlomique et du mésonéphros prolifèrent et migrent dans la gonade pour donner naissance à des cellules progénitrices indifférenciées capables de former tous les types cellulaires somatiques du testicule et de l'ovaire (figure 7.2). Cependant, à ce stade, l'expression génique et les marques épigénétiques de ces précurseurs indifférenciés sont identiques dans les embryons XX et XY (Dupont et Capel, 2021). La mutation chez la souris de facteurs contrôlant la spécification, la prolifération, la survie et/ou la migration des précurseurs indifférenciés de la gonade se traduit par une agénésie gonadique ou une perte progressive des gonades (Stévant et Nef, 2019). Certains de ces facteurs, tels les régulateurs transcriptionnels GATA4, NR5A1 ou WT1, ont été associés à la survenue de DSD (Eggers *et al.*, 2016).

Grâce à l'avènement des techniques de séquençage à haut débit et d'analyses bio-informatiques associées, il est désormais possible d'établir les profils d'expression génique (le transcriptome) de cellules individuelles (Stévant et Nef, 2018 ; Estermann et Smith, 2020). Ces approches appliquées à l'étude de la gonade embryonnaire en développement ont permis d'établir les relations de parenté, ou lignages, des cellules somatiques de la gonade (Sasaki *et al.*, 2021 ; Mayère *et al.*, 2022 ; Stévant *et al.*, 2019 ; Neirijnck *et al.*, 2023 ; Garcia-Alonso *et al.*, 2022). Les précurseurs somatiques indifférenciés forment initialement deux populations cellulaires présentes aussi bien dans les gonades XX que XY : les cellules précurseurs de cellules de soutien et les cellules interstitielles précurseurs des cellules stéroïdiennes. À partir de GW6 chez l'humain (E11 chez la souris), les programmes génétiques propres à chaque sexe se mettent en route, et les gonades adoptent des destins de différenciation ovarienne ou testiculaire qui se traduisent par l'apparition de cellules de pré-granulosa dans l'ovaire et de cellules de Sertoli dans le testicule.

À la différence des cellules somatiques, les cellules germinales sont spécifiées à l'extérieur de la gonade (Saitou et Hayashi, 2021). Les cellules germinales primordiales apparaissent précocement (GW2-3 chez l'humain, E6 chez la souris) dans la partie caudale de l'embryon, puis s'engagent dans un processus de prolifération et de migration le long de l'intestin postérieur et du mésentère dorsal pour coloniser les gonades indifférenciées à GW5 chez l'humain (E10 chez la souris, figure 7.2). Après cette première phase commune, le devenir des cellules germinales primordiales devient sexuellement dimorphique sous l'influence de signaux des cellules somatiques gonadiques. Dans le testicule embryonnaire, les cellules germinales mâles se divisent, puis entrent en quiescence jusqu'à l'initiation de la spermatogenèse et des cycles de prolifération/méiose qui se poursuivent tout au long de la vie de l'individu. En revanche, dans l'ovaire, il n'existe qu'une seule phase proliférative des cellules germinales pendant l'embryogenèse précoce qui définit la réserve ovarienne définitive de l'individu. À partir de GW10 chez l'humain (E13 chez la souris), les cellules germinales femelles initient la méiose, puis sont bloquées jusqu'à la reprise de ce processus au moment de l'ovulation à chaque cycle menstruel à partir de la puberté et jusqu'à la ménopause.



**Figure 7.2.** Différenciation du testicule et de l'ovaire embryonnaire à partir de la gonade indifférenciée.

Les précurseurs d'origine cœlomique et mésonéphrique donneront naissance aux cellules somatiques de la gonade. Les cellules germinales envahissent la gonade indifférenciée à E10 chez la souris. Dans la gonade XY, dès E12.5 les cordons testiculaires formés par les pro-spermatogonies entourés de cellules de Sertoli se forment, les cellules de Leydig stéroïdogènes se différencient en réponse à des signaux des cellules de Sertoli. Chez les embryons XX, les ovogonies en arrêt méiotique, les cellules de pré-granulosa et les cellules stromales sont présentes sans une organisation morphologique reconnaissable.

## Morphogenèse du testicule embryonnaire et du tractus génital mâle

Des expériences de lignage cellulaire, consistant à marquer une cellule unique de l'épithélium cœlomique de la gonade avec un traceur fluorescent et à suivre le destin de sa descendance, ont été réalisées à différents stades de développement sur des testicules de souris en culture (Karl et Capel, 1998). Ces travaux ont mis en évidence la dynamique des capacités de différenciation des précurseurs gonadiques, confirmées depuis par les analyses transcriptomiques sur cellules uniques (Mayère *et al.*, 2022 ; Stévant *et al.*, 2019). Jusqu'à E11.5, les précurseurs cœlomiques du testicule sont bipotents. Après migration dans la gonade, ils peuvent donner naissance à des cellules de Sertoli ainsi qu'à des cellules interstitielles précurseurs des cellules de Leydig. Puis, entre E11.5 et E12.5, les précurseurs de l'épithélium cœlomique produisent uniquement des cellules interstitielles, et enfin cessent toute délamination à partir de E12.5. Au-delà de la contribution majoritaire des progéniteurs cœlomiques, le testicule embryonnaire reçoit en outre l'apport de cellules migrant depuis le mésonéphros : les cellules endothéliales, qui formeront le vaisseau

coelomique, ainsi qu'une sous-population de précurseurs des cellules foetales de Leydig (Martineau *et al.*, 1997 ; Kumar et DeFalco, 2018).

À la suite de la mise en route du programme génétique mâle, les cellules de Sertoli sont le premier type cellulaire testiculaire à se différencier, à E11.5 (Rotgers *et al.*, 2018 ; Stévant et Nef, 2019 ; Mäkelä *et al.*, 2019) (figure 7.2). Les facteurs de croissance produits par les cellules de Sertoli orchestrent la morphogenèse et la différenciation testiculaires. Ainsi, entre autres, FGF9 et prostaglandine stimulent la prolifération des cellules de Sertoli, DHH et PDGF contrôlent la différenciation des cellules de Leydig, inhibine B régule la migration de cellules endothéliales depuis le mésonéphros adjacent. Les cellules de Sertoli adoptent des caractéristiques épithéliales et s'assemblent sous forme de cordons testiculaires (les futurs tubes séminifères) dans lesquels sont encapsulées les cellules germinales. Les cordons testiculaires sont entourés par une couche de cellules périvitubulaires myoïdes, des cellules similaires aux muscles lisses dont la contraction permettra l'expulsion du sperme des tubes séminifères à partir de la puberté. Les cellules de Sertoli et les cellules périvitubulaires myoïdes produisent des protéines extracellulaires qui forment une membrane basale, assurant ainsi la protection des cellules germinales à l'intérieur des cordons testiculaires.

Avant la GW7 chez l'humain (E12 chez la souris), les tractus génitaux des embryons XX et XY sont identiques, on y distingue aussi bien les tissus précurseurs du tractus génital femelle (le canal de Müller) que du tractus génital mâle (canal de Wolff) (Zhao et Yao, 2019). Les cellules de Sertoli produisent l'hormone anti-müllérienne (AMH) qui, au travers de son récepteur AMHR2, agit sur les tissus cibles du canal de Müller, provoquant leur dégénérescence spécifiquement dans les embryons XY avant GW10. Dans les embryons XX, le canal de Müller poursuit son développement : les trompes de Fallope, ou oviductes, l'utérus et la partie supérieure du vagin se forment (figure 7.1). Des déficiences dans la synthèse ou la réception du signal AMH conduisent au syndrome de persistance des canaux de Müller (*persistent müllerian duct syndrome*, PMDS), une forme de 46,XY DSD dans laquelle les garçons affectés ont des organes génitaux typiquement masculins associés à la présence de trompes de Fallope et d'utérus (Brunello et Rey, 2021).

Les cellules de Sertoli et les cellules foetales de Leydig contribuent à la synthèse d'androgènes, dont la testostérone, qui agissent *via* le récepteur aux androgènes (AR) et promeuvent la survie des dérivés du canal de Wolff (épididyme, canal déférent et vésicules séminales) spécifiquement dans les embryons XY, alors que ceux-ci dégèrent dans les embryons XX. Par ailleurs, la dihydrotestostérone (DHT), synthétisée localement par l'enzyme 5 alpha-réductase type II à partir des androgènes circulants, contrôle la formation des organes génitaux externes de type masculin (pénis et scrotum). Des mutations dans le gène codant le récepteur aux androgènes causent une insensibilité complète ou partielle aux androgènes (*androgen insensitivity syndrome*), une forme de 46,XY DSD dans laquelle les organes génitaux internes et externes sont féminisés à des degrés divers, malgré la présence de testicules et la production de testostérone (Hornig et Holterhus, 2021).

Enfin, les cellules de Sertoli produisent l'hormone INSL3, dont l'action combinée à celle des androgènes régule la descente en plusieurs phases des testicules, depuis la

position abdominale initiale jusqu'à la position scrotale finale. Les anomalies dans ce processus de descente se traduisent par l'absence de l'un ou des deux testicules dans le scrotum (cryptorchidie) (Eggers *et al.*, 2016).

## Morphogenèse de l'ovaire embryonnaire et du tractus génital femelle

Dans les gonades XX, l'épithélium cœlomique contribue aussi à la formation des lignages cellulaires somatiques de l'ovaire. La spécification des cellules de soutien ovariennes (les cellules de pré-granulosa, puis de granulosa) se fait entre E12 et E12.5, un jour après celle des cellules de Sertoli. La différenciation des cellules de pré-granulosa et granulosa s'étend au-delà de la période embryonnaire. Des expériences de traçage cellulaire et des analyses transcriptomiques sur cellules uniques ont montré que deux types de cellules de soutien se forment dans l'ovaire de souris (Stévant *et al.*, 2019 ; Niu et Spradling, 2020 ; Mork *et al.*, 2012). Les cellules générées à partir de l'épithélium cœlomique au cours de la vie embryonnaire vont former, dans la région centrale de l'ovaire, ou médulla, des follicules potentiellement impliqués dans la synthèse d'hormones ovariennes avant la puberté. Une deuxième population de cellules de granulosa se forme à partir de cellules exprimant le récepteur LGR5. Ces cellules, issues notamment de l'épithélium ovarien de surface après la naissance chez la souris, contribueront à la deuxième vague de folliculogénèse, et produiront des follicules corticaux activés tout au long de la vie reproductive de l'individu, constituant ainsi la réserve ovarienne pour la vie adulte. Dans les deux cas, les cellules de soutien ovariennes sont initialement quiescentes en arrêt mitotique (cellules de pré-granulosa), puis entrent en division et se différencient en cellules de granulosa matures exprimant AMH et AR au moment de l'activation de la folliculogénèse.

À la différence du testicule, l'ovaire embryonnaire ne possède pas de structures facilement identifiables tels les cordons testiculaires (figure 7.2). Ce manque de repères morphologiques a rendu l'étude du développement ovarien plus complexe que celle de la gonade mâle. Outre les cellules de la pré-granulosa et des cellules germinales, l'ovaire embryonnaire présente des cellules dites « stromales » peu nombreuses d'origine cœlomique et mésonéphrique. Celles-ci sont les précurseurs probables des cellules productrices d'hormones stéroïdiennes de la thèque, qui se différencient uniquement après la naissance (Rotgers *et al.*, 2018). Ainsi, l'ovaire embryonnaire de souris ne produit pas d'hormones stéroïdiennes. En absence de testostérone, les dérivés du canal de Wolff dégénèrent, et les organes génitaux externes forment les structures de type femelle (clitoris et lèvres). De plus, en absence de production d'AMH par l'ovaire embryonnaire, le canal de Müller poursuit son développement, et les organes génitaux internes féminins (trompes de Fallope, utérus et vagin) se développent. Enfin, la migration massive des cellules endothéliales observée dans le testicule ne se produit pas dans l'ovaire. Des expériences embryologiques et génétiques ont montré que la follistatine, exprimée spécifiquement dans l'ovaire sous le contrôle de WNT4, inhibe l'action de l'inhibine B, nécessaire à la migration de cellules endothéliales à partir du mésonéphros (Yao *et al.*, 2004 ; 2006).

## ►► Un contrôle de la différenciation des gonades par des cascades génétiques antagonistes

### SRY et SOX9 dans la différenciation testiculaire

À la fin des années 1950, l'étude de patients atteints du syndrome de Turner (phénotype féminin avec un seul chromosome X, 45,X0) ou du syndrome de Klinefelter (phénotype masculin, avec deux chromosomes X et un chromosome Y, 47,XXY) a établi que la détermination du phénotype masculin est liée à la présence du chromosome Y, et non pas au nombre de chromosomes X. Au cours des décennies suivantes, de nombreuses études ont tenté d'identifier le gène du chromosome Y responsable de la détermination testiculaire (McLaren, 1990). C'est en 1990 que le gène SRY (*sex determining region Y gene*) a été caractérisé dans un court fragment du chromosome Y, anormalement présent chez des patients XX qui avaient développé des testicules et un phénotype masculin (Sinclair *et al.*, 1990 ; Gubbay *et al.*, 1990). La preuve définitive du rôle de SRY dans la détermination mâle a été apportée par l'étude de souris transgéniques. Lorsque l'homologue murin *Sry* est exprimé de façon forcée, des souris présentent des testicules et un phénotype mâle démontrant que SRY est suffisant pour initier le développement mâle (Koopman *et al.*, 1991). Des mutations générées chez la souris ou identifiées chez des patients 46,XY DSD ont démontré que SRY est nécessaire pour la détermination testiculaire (Larney *et al.*, 2014 ; Miyawaki *et al.*, 2020).

SRY est un facteur de transcription de la famille SOX possédant un domaine HMG capable de reconnaître et de se lier à des séquences dans l'ADN et de réguler l'expression de gènes cibles. SRY est exprimé dans les précurseurs des cellules de soutien de la gonade indifférenciée, où il active une cascade génétique conduisant à la spécification des cellules de Sertoli (Koopman *et al.*, 2016) (figure 7.3).

L'expression de SRY dans le testicule embryonnaire de souris est très transitoire (entre E10 et E12), mais son action est cruciale pendant une fenêtre de temps critique de six heures, au cours de laquelle il initie l'expression d'un autre facteur de transcription à domaine HMG, SOX9 (Sekido *et al.*, 2004 ; Hiramatsu *et al.*, 2009 ; Gonen *et al.*, 2018). L'expression de SOX9 est conservée tout au long du développement des cellules de Sertoli, dont il régule la spécification, la différenciation et la maintenance. Des individus XY porteurs de mutations dans SOX9/SOX9 développent des ovaires à la place des testicules (Chaboissier *et al.*, 2004 ; Barrionuevo *et al.*, 2006 ; Vining *et al.*, 2021). De plus, des souris transgéniques XX exprimant SOX9 de façon ectopique dans les gonades ainsi que des patients 46,XX DSD avec des duplications dans le gène SOX9 développent des testicules à la place des ovaires (Vining *et al.*, 2021 ; Vidal *et al.*, 2001). Ainsi, SOX9 est l'effecteur principal de SRY et agit comme le déterminant majeur de l'identité cellulaire de type Sertoli, du destin testiculaire et donc de la différenciation mâle chez les mammifères. Ce rôle central de SOX9 dans la différenciation sexuelle de type mâle est conservé chez de nombreuses espèces de vertébrés, y compris celles dans lesquelles le système d'initiation de la détermination sexuelle n'est pas lié à la présence d'un chromosome Y (Vining *et al.*, 2021).

À la suite de la découverte de SRY et de SOX9, de multiples études ont été consacrées à élucider la cascade génétique en amont et en aval de ces deux facteurs (Vining *et al.*, 2021 ; Okashita et Tachibana, 2021). SOX9 et SRY agissent comme des

régulateurs transcriptionnels en se liant à des séquences similaires, et de nombreux gènes cibles ont été identifiés (Li *et al.*, 2014). SOX9 maintient sa propre expression et active celle de multiples gènes impliqués dans la différenciation des cellules de Sertoli (Rahmoun *et al.*, 2017). SOX9 stimule la prolifération et la spécification des cellules de Sertoli *via* l'activation de FGF9 et de PTGDS (impliqué dans la synthèse de prostaglandine D2) et leur épithélialisation *via* la régulation de molécules d'adhésion. En outre, SOX9 régule l'expression dans les cellules de Sertoli de l'hormone AMH, qui va agir dans la dégradation des canaux de Müller et de la protéine sécrétée DHH, qui stimule la différenciation des cellules de Leydig (figure 7.3).

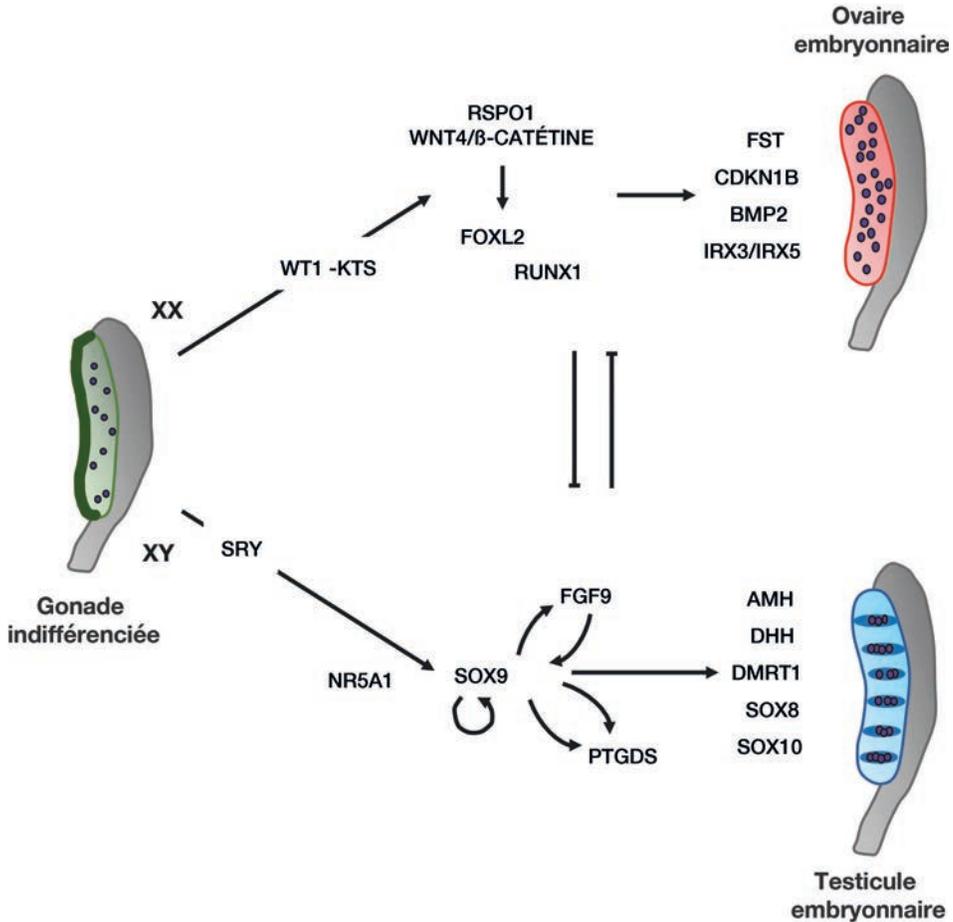


Figure 7.3. Les cascades génétiques de la différenciation testiculaire et ovarienne s'opposent.

## Signalisation WNT/β-caténine dans la différenciation ovarienne

Les expériences pionnières d'Alfred Jost (voir section « L'importance du sexe gonadique ») avaient établi que le développement du tractus génital femelle a lieu en absence de signaux hormonaux. Le concept de développement femelle par défaut a été élargi de façon erronée au développement des gonades, où la formation des

ovaires se ferait par défaut en absence de la cascade génétique initiée par l'action de SRY. Cette vision a été mise à l'épreuve par l'identification de gènes spécifiquement requis pour le développement ovarien et dont les mutations conduisent à une inversion sexuelle femelle/mâle (figure 7.3). L'équipe de Giovanna Camerino a décrit une famille consanguine où quatre frères de génotype 46,XX sans translocation de *SRY* présentaient un tractus génital et des organes sexuels externes de type masculin, suggérant la présence d'hormones testiculaires masculinisantes (Parma *et al.*, 2006). Ces patients étaient porteurs de mutations dans le gène R-SPONDIN-1 (RSPO1), qui a ainsi été identifié comme un facteur essentiel pour le développement ovarien. Des mutations dans le gène RSPO1 ont depuis été identifiées dans d'autres patients 46,XX DSD, y compris chez une patiente dont la gonade, un ovotesticule, contenait des tissus à la fois ovariens et testiculaires (Tomaselli *et al.*, 2008 ; Naasse *et al.*, 2017 ; Tallapaka *et al.*, 2018).

RSPO1 code pour une protéine sécrétée appartenant à la famille des protéines R-SPONDIN, conservées chez les vertébrés et impliquées dans l'activation de la voie canonique de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine. Les ligands WNT se lient à leurs récepteurs membranaires LRP et FRIZZLED et activent une cascade de transduction qui aboutit à la stabilisation de la protéine  $\beta$ -caténine et à la transcription de gènes cibles (de Lau *et al.*, 2014). Les différents membres de la famille RSPO présentent une organisation similaire avec un domaine thrombospondine de type I, potentiellement impliqué dans des interactions avec des protéines de la matrice extracellulaire, et des domaines *furin*, responsables de l'interaction avec des récepteurs de type LGR4, LGR5 et LGR6. Après recrutement à la membrane par les LGR, les protéines RSPO peuvent se lier à l'ubiquitine ligase E3 transmembranaire de type *ring finger* ZNRF3 et à son homologue RNF43, deux régulateurs négatifs de la voie WNT impliqués dans la clairance des récepteurs LRP et FRIZZLED à la membrane. Ainsi, les R-SPONDIN agissent comme des potentialisateurs de la voie canonique WNT/ $\beta$ -caténine. En accord avec le rôle de la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine dans le développement ovarien, des mutations dans le gène WNT4 ont aussi été identifiées chez des patients 46,XX DSD qui présentent une masculinisation des organes génitaux internes et/ou un développement d'ovotesticules (Biaison-Lauber *et al.*, 2004 ; Mandel *et al.*, 2008).

Chez la souris, RSPO1 et WNT4 sont exprimés dans l'épithélium coelomique de la gonade indifférenciée, où ils activent la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine et stimulent la prolifération des précurseurs somatiques de la gonade (Chassot *et al.*, 2012). L'expression de RSPO1 et WNT4 et l'activation de la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine sont maintenues dans l'ovaire en développement, alors qu'elles sont restreintes à l'épithélium coelomique lors de la différenciation testiculaire (Stévant *et al.*, 2019 ; Parma *et al.*, 2006 ; Chassot *et al.*, 2012). De façon similaire, chez le fœtus humain, l'expression de RSPO1 est maintenue dans l'ovaire, alors qu'elle est fortement diminuée dans le testicule (Tomaselli *et al.*, 2011 ; Lecluze *et al.*, 2020).

Les souris XX mutantes pour RSPO1, WNT4 ou CTNNB1 (le gène codant pour la  $\beta$ -caténine) présentent à l'âge adulte des ovotesticules ; il s'agit de gonades comprenant à la fois des tissus ovariens et des structures de type testiculaire formées par des cellules semblables aux cellules de Sertoli (Chassot *et al.*, 2008 ; Vainio *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2009 ; Tomizuka *et al.*, 2008). Il a été montré que la masculinisation

des gonades déficientes pour la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine est un phénomène séquentiel. Dans un premier temps, les cellules mutantes de pré-granulosa se différencient prématurément dès E15.5. Ces cellules sortent de quiescence et expriment des marqueurs de cellules de granulosa mature tels qu'AMH et AR, qui sont normalement exprimés uniquement dans les follicules activés après la naissance. Dans un deuxième temps, à E17.5, les cellules de granulosa se transdifférencient en cellules de type Sertoli marquées par l'expression de SOX9 et leur organisation en tubes séminifères anormaux (Maatouk *et al.*, 2013). Outre les défauts de masculinisation des cellules de soutien, les ovotesticules des individus XX mutants pour RSPO1, WNT4 ou CTNNB1 se caractérisent par la présence d'un vaisseau coelomique de type masculin, la perte progressive des cellules germinales, et la synthèse anormale d'androgènes conduisant au maintien des dérivés du canal de Wolff et à la masculinisation du tractus génital interne (Chassot *et al.*, 2008 ; Vainio *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2009 ; Tomizuka *et al.*, 2008). L'expression de WNT4 est fortement diminuée dans les gonades XX mutantes pour RSPO1 et CTNNB1, indiquant la présence d'une boucle de rétrocontrôle positif de la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine (Chassot *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données permet d'affirmer que la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine est essentielle pour le développement ovarien.

Le facteur de transcription FOXL2 est un des marqueurs les plus précoces de l'identité ovarienne (figure 7.3). FOXL2 est exprimé dans les cellules de la pré-granulosa dès leur spécification à E12-E12.5, et son expression est maintenue dans les cellules de la granulosa mature des follicules en croissance après la naissance (Schmidt *et al.*, 2004). L'expression de FOXL2 est fortement diminuée dans les gonades XX mutantes pour RSPO1, WNT4 et CTNNB1 (Maatouk *et al.*, 2013 ; Auguste *et al.*, 2011 ; Nicol et Yao, 2015), indiquant que FOXL2 est potentiellement une cible de la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine. Chez la chèvre, la perte d'expression de FOXL2 conduit à une inversion sexuelle femelle-mâle (Boulanger *et al.*, 2014), alors que chez la souris, la perte de fonction de FOXL2 n'a pas d'impact sur le développement ovarien au cours de l'embryogenèse (Schmidt *et al.*, 2004 ; Uda *et al.*, 2004 ; Ottolenghi *et al.*, 2005). Cependant, le phénotype ovotesticulaire des doubles mutants murins RSPO1/FOXL2 et WNT4/FOXL2 est aggravé par rapport à celui des simples mutants RSPO1 ou WNT4, indiquant que la voie WNT/ $\beta$ -caténine et FOXL2 coopère au cours de la différenciation ovarienne embryonnaire chez la souris (Auguste *et al.*, 2011 ; Ottolenghi *et al.*, 2007). Par ailleurs, FOXL2 et le facteur de transcription RUNX1 régulent des cibles communes impliquées dans la différenciation des cellules de la granulosa, et les gonades XX double mutantes FOXL2/RUNX1 sont masculinisées (Nicol *et al.*, 2019).

## Le variant -KTS de WT1, essentiel pour la détermination ovarienne chez la souris

Si la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine et les facteurs de transcription FOXL2 et RUNX1 sont nécessaires à la progression de la différenciation ovarienne, les gènes responsables de l'initiation du programme gonadique femelle sont longtemps restés inconnus. En 2023, notre équipe de recherche, avec le soutien du programme ANR SexDiff, a établi que le variant -KTS de WT1 (*wilms tumor suppressor*) est essentiel

pour la détermination ovarienne chez la souris (Gregoire *et al.*, 2023). Le gène WT1, essentiel pour le développement gonadique, code deux isoformes majeures obtenues par épissage alternatif et contenant ou pas les acides aminés lysine (K), thréonine (T) et sérine (S) entre les deux derniers doigts de zinc (Hammes *et al.*, 2001). L'isoforme -KTS agit principalement comme un facteur de transcription, alors que l'isoforme +KTS se lie à l'ARN et agirait comme un régulateur post-transcriptionnel. Le syndrome de Frasier, une pathologie humaine qui se caractérise entre autres par une altération de la fonction rénale et la féminisation de l'appareil génital des patients XY, est causé par un déséquilibre dans la production des isoformes de WT1 en faveur de -KTS (Barboux *et al.*, 1997 ; Klamt *et al.*, 1998). Notre équipe a analysé des modèles murins porteurs de mutations dans l'une ou l'autre des isoformes de WT1. En absence de WT1 -KTS, les gonades XX ne se différencient pas en ovaire : les cellules progénitrices des cellules de soutien sont spécifiées, mais ne se différencient pas en cellules de pré-granulosa. En absence de WT1 +KTS, les gonades XY se différencient en ovaires. Nous avons montré que cette inversion de sexe est due à un excès de production d'isoformes -KTS, qui provoque l'accélération du développement ovarien, empêchant l'activation de SRY et la mise en route du programme testiculaire. Ainsi, l'isoforme -KTS de WT1 est nécessaire et suffisante pour lancer le programme de différenciation ovarienne.

## Les cascades génétiques mâle et femelle s'opposent

Les mutations de perte ou de gain de fonction des acteurs moléculaires de la différenciation gonadique ont révélé que les cellules gonadiques XY peuvent répondre aux signaux de différenciation ovariens et que les précurseurs XX sont capables de suivre le programme testiculaire. Ainsi, dans des gonades de souris XY porteuses de mutations dans les gènes SRY ou SOX9, non seulement le développement testiculaire n'a pas lieu, mais un programme de développement ovarien se met en route (Miyawaki *et al.*, 2020 ; Chaboissier *et al.*, 2004 ; Barrionuevo *et al.*, 2006). L'activation ectopique de la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine ou de FOXL2 dans des gonades XY de souris perturbe le développement testiculaire et conduit à la différenciation d'ovotesticules (Ottolenghi *et al.*, 2007 ; Maatouk *et al.*, 2008 ; Nicol *et al.*, 2018). De façon similaire, le développement testiculaire et la virilisation des organes génitaux sont perturbés chez des patients 46,XY DSD porteurs de duplications d'une partie du chromosome 1 contenant les gènes WNT4 et RSPO1 (Jordan *et al.*, 2001). À l'inverse, la surexpression de SRY ou de SOX9 dans les cellules des gonades XX chez des souris transgéniques ou des patients 46,XX DSD porteurs d'une translocation de SRY ou d'une duplication de SOX9 empêche la différenciation ovarienne au profit de la formation d'un testicule (Koopman *et al.*, 1991 ; Miyawaki *et al.*, 2020 ; Vidal *et al.*, 2001 ; Huang *et al.*, 1999).

Ces observations soulignent la capacité des cellules XX et XY à répondre aux signaux de différenciation du sexe gonadique opposé. Des analyses du paysage épigénétique des précurseurs gonadiques de souris fournissent une base moléculaire pour ce phénomène. Il a été montré que l'expression génique et l'ouverture de la chromatine dans les précurseurs gonadiques indifférenciés XX et XY sont très similaires (Stévant *et al.*, 2019 ; Garcia-Moreno *et al.*, 2018). À ce stade, des gènes clés de la détermination sexuelle contrôlant le développement mâle (SOX9, FGF9, DMRT1) et femelle (WNT4, RSPO1, FOXL2) sont bivalents. Ils présentent au niveau de

leur chromatine aussi bien des marques activatrices (H3K4me3) que répressives (H3K27me3). Ces gènes sont soit faiblement exprimés soit prêts à être activés, conférant ainsi aux gonades indifférenciées XX et XY la capacité à répondre aux cascades génétiques contrôlant le développement testiculaire et ovarien (Garcia-Moreno *et al.*, 2018 ; 2019). De façon intéressante, de nombreux gènes spécifiques des cellules de Sertoli ou des cellules de la granulosa gardent le caractère bivalent et l'aptitude à être exprimés, y compris lorsque les différenciations ovarienne et testiculaire sont respectivement bien avancées. Ainsi, si l'un des programmes génétiques de la différenciation sexuelle est perturbé, le programme alternatif prend le dessus.

Des données génétiques ont révélé que le programme de différenciation ovarienne doit être activement supprimé dans les gonades XY pour que le développement testiculaire puisse avoir lieu. ZNRF3, l'ubiquitine ligase impliquée dans l'internalisation et la dégradation des complexes WNT ligand/récepteur dont l'action est contrée par RSPO1, est un facteur essentiel pour inhiber la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine dans les testicules en différenciation. Les individus XY porteurs de mutations dans ZNRF3 présentent une activation anormale de la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine dans la gonade, un développement testiculaire anormal et une masculinisation des organes génitaux (Harris *et al.*, 2018). Par ailleurs, les gonades XY mutantes pour le régulateur transcriptionnel CBX2, impliqué entre autres dans la répression de LEF1, un activateur de la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine, se développent comme des ovaires atrophiés (Garcia-Moreno *et al.*, 2019).

L'importance des mécanismes qui suppriment le développement ovarien dans les gonades XY est illustrée par l'analyse de doubles mutants déficients pour des gènes de la différenciation à la fois testiculaire et ovarienne. Le développement testiculaire est perturbé dans les gonades XY déficientes pour CBX2, pour le régulateur de SRY Gadd45g, pour le signal FGF9 ou pour le récepteur FGFR2, impliqués dans l'amplification de l'expression de SOX9 et la prolifération des cellules de Sertoli. En revanche, le développement testiculaire est amélioré lorsque les acteurs de la différenciation ovarienne sont aussi invalidés, dans les double mutants CBX2/WNT4, GADD45g/RSPO1, FGF9/WNT4, FGFR2/WNT4 ou FGFR2/FOXL2 (Garcia-Moreno *et al.*, 2019 ; Jameson *et al.*, 2012 ; Warr *et al.*, 2022 ; Bagheri-Fam *et al.*, 2017). La mutation des acteurs de la voie WNT/ $\beta$ -caténine n'est pas suffisante pour restaurer un développement testiculaire normal en absence de SOX9. Néanmoins, les doubles mutants XY SOX9/RSPO1, SOX9/CTNNB1 et SOX9/WNT4 forment des ovotesticules où d'autres gènes de la famille SOX peuvent induire la différenciation de cellules de type Sertoli (Nicol et Yao, 2015 ; Lavery *et al.*, 2012 ; Tang *et al.*, 2020 ; Richardson *et al.*, 2020).

Comment se fait l'opposition entre les cascades génétiques de la différenciation ovarienne et testiculaire d'un point de vue moléculaire ? La signalisation WNT/ $\beta$ -caténine interfère avec l'activation de la transcription de SOX9 par NR5A1 (Bernard *et al.*, 2012). De plus, FOXL2 se lie à des régions régulatrices potentiellement impliquées dans la répression de l'expression de SOX9 et *DMRT1* (Nicol *et al.*, 2018). À l'inverse, SOX9 et SRY inhibent la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine en régulant la localisation, la dégradation et/ou l'activité de  $\beta$ -caténine ou de ses cofacteurs LEF/TCF par des mécanismes dépendants et indépendants de leur fonction de régulateurs transcriptionnels (Bernard *et al.*, 2008 ; Sinha *et al.*, 2021 ; Kormish *et al.*, 2010). Enfin, SOX9 se lie sur des régions régulatrices de FOXL2 où il pourrait agir comme un répresseur (Rahmoun

*et al.*, 2017), et SOX9 et FOXL2 se lient à des régions communes de la chromatine où ils pourraient réguler de façon antagoniste des cibles partagées (Nicol *et al.*, 2018).

## La maintenance du sexe gonadique chez l'adulte

Les analyses du paysage épigénétique ont révélé que les gènes de la différenciation ovarienne tels RSP01, WNT4 ou FOXL2 gardent un état bivalent de leur chromatine dans les cellules de Sertoli adultes, suggérant que ces cellules ont gardé une mémoire épigénétique de leur caractère bipotentiel pendant l'embryogenèse (Garcia-Moreno *et al.*, 2019). Ainsi, lorsque des régulateurs essentiels de l'identité des cellules de Sertoli tels que les facteurs de transcription DMRT1, SOX9 ou SOX8 sont mutés chez l'adulte, les cellules de Sertoli perdent leur identité et se transdifférencient en cellules de la granulosa (Barrionuevo *et al.*, 2016 ; Matson *et al.*, 2011). De même, la mutation dans les ovaires adultes de FOXL2, des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes ESR1/ESR2, du gène CYP19A1 codant l'enzyme critique de la synthèse des œstrogènes, ou de TRIM28 codant un régulateur épigénétique, se traduit par une perte de l'identité des cellules de la granulosa et une transdifférenciation en cellules de Sertoli avec activation de l'expression de SOX9 (Uhlenhaut *et al.*, 2009 ; Couse *et al.*, 1999 ; Britt *et al.*, 2002 ; Rossitto *et al.*, 2022). Il apparaît donc que l'antagonisme entre les cascades génétiques mâle et femelle perdure bien après les étapes embryonnaires de différenciation de la gonade, et que les facteurs de la détermination sexuelle doivent rester actifs pour maintenir l'identité des cellules de Sertoli ou de granulosa dans les gonades adultes (Jiménez *et al.*, 2021).

### ► Les objectifs du projet ANR SexDiff

Le projet ANR SexDiff, « Régulation de la détermination du sexe et de la différenciation ovarienne : implications dans les troubles du développement sexuel », est un projet collaboratif entre trois équipes de recherche dirigées par Marie-Christine Chaboissier à l'Institut de biologie Valrose (iBV) de Nice, par Frédéric Chalmel à l'Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset) de Rennes et par Anu Bashamboo à l'Institut Pasteur de Paris. Ces trois partenaires ont réuni leurs expertises respectives pour l'étude de modèles murins de la détermination du sexe, l'analyse bio-informatique de la différenciation des gonades, et la pathophysiologie et la modélisation des DSD. Les objectifs de recherche sont :

- d'identifier les acteurs impliqués dans l'initiation de la différenciation ovarienne et dans l'activation de la cascade génétique de la détermination sexuelle femelle (Gregoire *et al.*, 2023) ;
- d'élucider la cascade génétique en aval du gène RSP01 dans le but de déterminer les facteurs essentiels pour la différenciation des lignages cellulaires ovariens ;
- d'intégrer les résultats des analyses bio-informatiques des modèles murins et des patients DSD avec les données disponibles dans la littérature et les rendre publiques sous forme d'une base de données sur les réseaux génétiques de la différenciation gonadique.

Les résultats de ce projet contribueront à combler le déficit de connaissances dans le processus de différenciation ovarienne et auront des répercussions potentielles sur le diagnostic des 46,XX DSD.

### Remerciements

Nous remercions les membres des équipes impliquées dans l'étude ANR SexDiff, ainsi que l'ANR pour la confiance accordée à ce projet.

## ► Références bibliographiques

- Auguste A. *et al.*, 2011. Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. *Sex. Dev.*, 5, 304-317.
- Bagheri-Fam S. *et al.*, 2017. Testis determination requires a specific FGFR2 isoform to repress FOXL2. *Endocrinology*, 158, 3832-3843.
- Barboux S. *et al.*, 1997. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat. Genet.*, 17, 467-470.
- Barrionuevo F. *et al.*, 2006. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol. Reprod.*, 74, 195-201.
- Barrionuevo F.J. *et al.*, 2016. Sox9 and Sox8 protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *eLife*, 5, e15635.
- Bernard P., Sim H., Knower K., Vilain E., Harley V., 2008. Human SRY inhibits beta-catenin-mediated transcription. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 40, 2889-2900.
- Bernard P. *et al.*, 2012. Wnt signaling in ovarian development inhibits Sf1 activation of Sox9 via the Tesco enhancer. *Endocrinology*, 153, 901-912.
- Biason-Lauber A., Konrad D., Navratil F., Schoenle E.J.A., 2004. WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N. Engl. J. Med.*, 351, 792-798.
- Boulanger L. *et al.*, 2014. FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr. Biol.*, 24, 404-408.
- Britt K.L. *et al.*, 2002. Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. *FASEB J.*, 16, 1389-1397.
- Brunello F.G., Rey R.A., 2021. AMH and AMHR2 involvement in congenital disorders of sex development. *Sex. Dev.*, 1-9. <https://doi.org/10.1159/000518273>
- Capel B., 2017. Vertebrate sex determination: Evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nat. Rev. Genet.*, 18, 675-689.
- Chaboissier M.-C. *et al.*, 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development*, 131, 1891-1901.
- Chassot A.-A. *et al.*, 2008. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 1264-1277.
- Chassot A.-A. *et al.*, 2012. WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development*, 139, 4461-4472.
- Couse J.F. *et al.*, 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*, 286, 2328-2331.
- de Lau W., Peng W.C., Gros P., Clevers H., 2014. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: Regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.*, 28, 305-316.
- Délot E.C., Vilain E., 2021. Towards improved genetic diagnosis of human differences of sex development. *Nat. Rev. Genet.*, 22, 588-602.
- Dupont S., Capel B., 2021. The chromatin state during gonadal sex determination. *Sex. Dev.*, 15, 308-316.
- Eggers S. *et al.*, 2016. Disorders of sex development: Insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.*, 17, 243.
- Estermann M.A., Smith C.A., 2020. Applying single-cell analysis to gonadogenesis and DSDs (Disorders/Differences of Sex Development). *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 6614.

- Garcia-Alonso L. *et al.*, 2022. Single-cell roadmap of human gonadal development. *Nature*, 607, 540-547.
- Garcia-Moreno S.A., Plebanek M.P., Capel B., 2018. Epigenetic regulation of male fate commitment from an initially bipotential system. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 468, 19-30.
- Garcia-Moreno S.A. *et al.*, 2019. CBX2 is required to stabilize the testis pathway by repressing Wnt signaling. *PLoS Genet.*, 15, e1007895.
- Gonen N. *et al.*, 2018. Sex reversal following deletion of a single distal enhancer of Sox9. *Science*, 360, 1469-1473.
- Gregoire E.P. *et al.*, 2023. The -KTS splice variant of WT1 is essential for ovarian determination in mice. *Science*, 382, 600-606.
- Gubbay J. *et al.*, 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346, 245-250.
- Hammes A. *et al.*, 2001. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell.*, 106, 319-329.
- Harris A. *et al.*, 2018. ZNRf3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 115, 5474-5479.
- Hiramatsu R. *et al.*, 2009. A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development*, 136, 129-138.
- Hornig N.C., Holterhus P.-M., 2021. Molecular basis of androgen insensitivity syndromes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 523, 111146.
- Huang B., Wang S., Ning Y., Lamb A.N., Bartley J., 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am. J. Med. Genet.*, 87, 349-353.
- Jameson S.A., Lin Y.-T., Capel B., 2012. Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev. Biol.*, 370, 24-32.
- Jiménez R., Burgos M., Barrionuevo F.J., 2021. Sex maintenance in mammals. *Genes (Basel)*, 12, 999.
- Jordan B.K. *et al.*, 2001. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am. J. Hum. Genet.*, 68, 1102-1109.
- Josso N., 2008. Professor Alfred Jost: The builder of modern sex differentiation. *Sex. Dev.*, 2, 55-63.
- Karl J., Capel B., 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.*, 203, 323-333.
- Klamt B. *et al.*, 1998. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 709-714.
- Koopman P., Sinclair A., Lovell-Badge R., 2016. Of sex and determination: Marking 25 years of Randy, the sex-reversed mouse. *Development*, 143 (10), 1633-7. <https://doi.org/10.1242/dev.137372>
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R., 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351, 117-121.
- Kormish J.D., Sinner D., Zorn A.M., 2010. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev. Dyn.*, 239, 56-68.
- Kumar D.L., DeFalco T., 2018. A perivascular niche for multipotent progenitors in the fetal testis. *Nat. Commun.*, 9, 4519.
- Larney C., Bailey T.L., Koopman P., 2014. Switching on sex: Transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development*, 141, 2195-2205.
- Lavery R. *et al.*, 2012. Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genet.*, 8, e1003170.
- Lecluze E. *et al.*, 2020. Dynamics of the transcriptional landscape during human fetal testis and ovary development. *Hum. Reprod.*, 35, 1099-1119.
- Lee P.A., Houk C.P., Ahmed S.F., Hughes I.A., 2006. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *Pediatrics*, 118, e488-500.
- Li Y., Zheng M., 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.

- Liu C.-F., Bingham N., Parker K., Yao H.H.-C., 2009. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum. Mol. Genet.*, 18, 405-417.
- Lockley E.C., Eizaguirre C., 2021. Effects of global warming on species with temperature-dependent sex determination: Bridging the gap between empirical research and management. *Evol. Appl.*, 14, 2361-2377.
- Maatouk D.M., Mork L., Chassot A.-A., Chaboissier M.-C., Capel B., 2013. Disruption of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa cells in the perinatal Wnt4 mutant ovary. *Dev. Biol.*, 383, 295-306.
- Maatouk D.M. *et al.*, 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 2949-2955.
- Mäkelä J.-A., Koskenniemi J.J., Virtanen H.E., Toppari J., 2019. Testis development. *Endocr. Rev.*, 40, 857-905.
- Mandel H. *et al.*, 2008. SERKAL syndrome: An autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am. J. Hum. Genet.*, 82, 39-47.
- Martineau J., Nordqvist K., Tilmann C., Lovell-Badge R., Capel B., 1997. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol.*, 7, 958-968.
- Matson C.K. *et al.*, 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 476, 101-104.
- Mayère C. *et al.*, 2022. Origin, specification and differentiation of a rare supporting-like lineage in the developing mouse gonad. *Sci. Adv.*, 8, eabm0972.
- McLaren A., 1990. Sex determination. What makes a man a man? *Nature*, 346, 216-217.
- Miyawaki S. *et al.*, 2020. The mouse Sry locus harbors a cryptic exon that is essential for male sex determination. *Science*, 370, 121-124.
- Mork L. *et al.*, 2012. Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biol. Reprod.*, 86, 37.
- Naasse Y. *et al.*, 2017. A novel homozygous missense mutation in the FU-CRD2 domain of the R-spondin1 gene associated with familial 46,XX DSD. *Sex. Dev.*, 11, 269-274.
- Nef S., Stévant I., Greenfield A., 2019. Characterizing the bipotential mammalian gonad. *Curr. Top Dev. Biol.*, 134, 167-194.
- Neirijnck Y. *et al.*, 2023. Single-cell transcriptomic profiling redefines the origin and specification of early adrenogonadal progenitors. *Cell Rep.*, 42, 112191.
- Nicol B., Yao H.H.-C., 2015. Gonadal identity in the absence of pro-testis factor SOX9 and pro-ovary factor beta-catenin in mice. *Biol. Reprod.*, 93, 35.
- Nicol B. *et al.*, 2018. Genome-wide identification of FOXL2 binding and characterization of FOXL2 feminizing action in the fetal gonads. *Hum. Mol. Genet.*, 27, 4273-4287.
- Nicol B. *et al.*, 2019. RUNX1 maintains the identity of the fetal ovary through an interplay with FOXL2. *Nat. Commun.*, 10, 5116.
- Niu W., Spradling A.C., 2020. Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 117, 20015-20026.
- Okashita N., Tachibana M., 2021. Transcriptional regulation of the Y-Linked mammalian testis-determining gene SRY. *Sex. Dev.*, 15, 351-359.
- Ottolenghi C. *et al.*, 2005. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 2053-2062.
- Ottolenghi C. *et al.*, 2007. Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum. Mol. Genet.*, 16, 2795-2804.
- Parma P. *et al.*, 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat. Genet.*, 38, 1304-1309.
- Rahmoun M. *et al.*, 2017. In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Res.*, 45, 7191-7211.
- Richardson N. *et al.*, 2020. Sox8 and Sox9 act redundantly for ovarian-to-testicular fate reprogramming in the absence of R-spondin1 in mouse sex reversals. *eLife*, 9, e53972.
- Rossitto M. *et al.*, 2022. TRIM28-dependent SUMOylation protects the adult ovary from activation of the testicular pathway. *Nat. Commun.*, 13, 4412.

- Rotgers E., Jørgensen A., Yao H.H.-C., 2018. At the crossroads of fate-somatic cell lineage specification in the fetal gonad. *Endocr. Rev.*, 39, 739-759.
- Saitou M., Hayashi K., 2021. Mammalian in vitro gametogenesis. *Science*, 374, eaaz6830.
- Sasaki K. *et al.*, 2021. The embryonic ontogeny of the gonadal somatic cells in mice and monkeys. *Cell Rep.*, 35, 109075.
- Schmidt D. *et al.*, 2004. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131, 933-942.
- Sekido R., Bar I., Narváez V., Penny G., Lovell-Badge R., 2004. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.*, 274, 271-279.
- Sinclair A.H. *et al.*, 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346, 240-244.
- Sinha A. *et al.*, 2021. Repression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by SOX9 and Mastermind-like transcriptional coactivator 2. *Sci. Adv.*, 7, eabe0849.
- Stévant I., Nef S., 2018. Single cell transcriptome sequencing: A new approach for the study of mammalian sex determination. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 468, 11-18.
- Stévant I., Nef S., 2019. Genetic control of gonadal sex determination and development. *Trends Genet.*, 35, 346-358.
- Stévant I. *et al.*, 2019. Dissecting cell lineage specification and sex fate determination in gonadal somatic cells using single-cell transcriptomics. *Cell Rep.*, 26, 3272-3283.e3.
- Stöck M. *et al.*, 2021. A brief review of vertebrate sex evolution with a pledge for integrative research: Towards 'sexomics'. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 376, 20200426.
- Tallapaka K., Venugopal V., Dalal A., Aggarwal S., 2018. Novel RSPO1 mutation causing 46,XX testicular disorder of sex development with palmoplantar keratoderma: A review of literature and expansion of clinical phenotype. *Am. J. Med. Genet. A*, 176, 1006-1010.
- Tang F., Richardson N., Albina A., Chaboissier M.-C., Perea-Gomez A., 2020. Mouse gonad development in the absence of the pro-ovary factor WNT4 and the pro-testis factor SOX9. *Cells*, 9.
- Tomaselli S. *et al.*, 2008. Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum. Mutat.*, 29, 220-226.
- Tomaselli S. *et al.*, 2011. Human RSPO1/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments  $\beta$ -catenin signaling. *PLoS ONE*, 6, e16366.
- Tomizuka K. *et al.*, 2008. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 1278-1291.
- Uda M. *et al.*, 2004. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum. Mol. Genet.*, 13, 1171-1181.
- Uhlenhaut N.H. *et al.*, 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139, 1130-1142.
- Vainio S., Heikkilä M., Kispert A., Chin N., McMahon A.P., 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397, 405-409.
- Vidal V.P., Chaboissier M.C., de Rooij D.G., Schedl A., 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.*, 28, 216-217.
- Vining B., Ming Z., Bagheri-Fam S., Harley V., 2021. Diverse regulation but conserved function: SOX9 in vertebrate sex determination. *Genes (Basel)*, 12, 486.
- Warr N. *et al.*, 2022. Gadd45g is required for timely Sry expression independently of RSPO1 activity. *Reproduction*, 163, 333-340.
- Yao H.H.-C., Aardema J., Holthusen K., 2006. Sexually dimorphic regulation of inhibin beta B in establishing gonadal vasculature in mice. *Biol. Reprod.*, 74, 978-983.
- Yao H.H.C. *et al.*, 2004. Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev. Dyn.*, 230, 210-215.
- Zhao F., Yao H.H.-C., 2019. A tale of two tracts: History, current advances, and future directions of research on sexual differentiation of reproductive tracts. *Biol. Reprod.*, 101, 602-616.