

# Mammifères, sexe, gènes et génome : les leçons du modèle de la chèvre intersexuée

## *Mammals, sex, genes and genome: lessons from the intersex goat model*

Par Daniel VAIMAN<sup>(1)</sup>

(communication présentée le 20 octobre 2005)

### RÉSUMÉ

Chez la chèvre domestique, la mutation PIS (polled intersex syndrome) entraîne à la fois une absence de cornes dans les deux sexes, et une inversion sexuelle touchant exclusivement les individus XX. Le mode de transmission est dominant pour les cornes et récessif pour l'inversion sexuelle. Chez les mutants XX  $PIS^+$ , l'expression de gènes, spécifiques du testicule est observée de façon très précoce durant le développement gonadique. Par clonage positionnel, nous avons démontré que la mutation PIS consiste en la délétion d'un élément d'ADN de 11,7 kilobases, élément régulateur affectant l'expression de deux gènes, *PISRT1* et *FOXL2*, qui agiraient de façon synergique pour déterminer le sexe femelle et promouvoir la différenciation ovarienne. L'extinction transcriptionnelle de ces deux gènes conduit à la formation très précoce de testicules chez les femelles génétiques mutantes (XX  $PIS^+$ ). En accord avec le profil d'expression et les données de la littérature, nous proposons l'hypothèse selon laquelle *FOXL2* serait un gène-clé de la différenciation ovarienne et que l'ARN non codant *PISRT1* pourrait agir comme un facteur répresseur de *SOX9*, gène-clé de la cascade de détermination mâle. Dans cette hypothèse, *SRY*, le facteur de détermination testiculaire, inhiberait ces deux gènes dans les gonades XY, pour permettre la différenciation testiculaire.

**Mots-clés :** chèvre, déterminisme du sexe, génomique, ovaire, cornes.

### SUMMARY

In goats, the PIS (polled intersex syndrome) mutation is responsible for the absence of horns in both males and females and sex-reversal affecting exclusively XX individuals. The mode of inheritance is dominant for the polled trait and recessive for sex-reversal. In XX  $PIS^+$  mutants, the expression of testis-specific genes is observed very precociously during gonad development. By positional cloning, we demonstrate that the PIS mutation is an 11.7-kb regulatory-deletion affecting the expression of two genes, *PISRT1* and *FOXL2* which could act synergistically to promote ovarian differentiation. The transcriptional extinction of these two genes leads, very early, to testis-formation in XX homozygous  $PIS^+$  mutants. According to their expression profiles and bibliographic data, we propose that *FOXL2* may be an ovary-differentiating gene, and the non-coding RNA *PISRT1*, an anti-testis factor repressing *SOX9*, a key regulator of testis differentiation. Under this hypothesis, *SRY*, the testis-determining factor would inhibit these two genes in the gonads of XY males, to ensure testis differentiation.

**Key words:** goat, sex determinism, genomics, ovary, horns.

(1) DR2 INRA, Département de Génétique Animale et U709 INSERM, Hôpital Cochin, 123 Boulevard de Port-Royal, 75014 Paris ([vaiman@cochin.inserm.fr](mailto:vaiman@cochin.inserm.fr)).

• LE CONTEXTE HISTORIQUE

Les années suivant la révolution industrielle virent l'apparition d'un mode de pensée plus « scientifique » dans nombre des secteurs de l'activité humaine. L'élevage n'échappa pas à cette règle, avec en particulier l'apparition d'un meilleur suivi des animaux, sous l'angle de l'héritabilité de leurs caractères phénotypiques. Cette organisation plus construite de l'élevage passa par l'apparition de « herdbooks » permettant le suivi de pedigrees et celui de la ségrégation de caractères dans ces pedigrees. La redécouverte des lois de Mendel, au tournant des années 1900 par De Vries, Correns et Von Tschermak, allait fournir une base scientifique aux observations pragmatiques de milliers d'années de sélection appliquée aux chiens, aux ruminants, aux porcs et à nombre d'autres espèces d'intérêt.

C'est dans ce contexte de « révolution » de la pensée biologique que furent décrites, à l'École Vétérinaire de Maisons-Alfort, une série de phénotypes affectant la fertilité de la chèvre domestique, à savoir l'existence de nombreux cas d'intersexualité dans cette espèce (figure 1).



Figure 1 : Deux boucs, l'un cornu et l'autre sans cornes. Ce dernier est porteur de l'allèle induisant une inversion sexuelle chez les femelles (XX mâles).

Sans aucune connaissance des chromosomes et de la base chromosomique du déterminisme du sexe, les précurseurs de l'École Vétérinaire ne purent que décrire des phénotypes inhabituels concernant la structure des gonades et de l'appareil génital, anomalies qui semblaient néanmoins apparaître avec une grande fréquence dans l'espèce caprine. En termes génétiques, l'intersexualité implique une discordance entre le sexe phénotypique et le sexe génétique. Connaissant les chromosomes sexuels, on comprend donc que deux situations d'intersexualité peuvent exister : l'apparition d'individus XY femelles et l'apparition d'individus XX mâles. Cependant cette interprétation n'a pu être donnée que tardivement, dans la mesure où la première description d'un chromosome Y, supposé porteur du déterminant primaire du sexe mâle (TDF pour Testis Determining Factor) chez les mammifères, date de 1959, dans l'espèce humaine. Le TDF fut identifié au niveau moléculaire plus de trente ans après et fut nommé *SRY* (Sex determining Region of the Y chromosome) (BERTA *et al.*, 1990). Quinze années plus tard, son mode d'action demeure encore mal compris (figure 2).

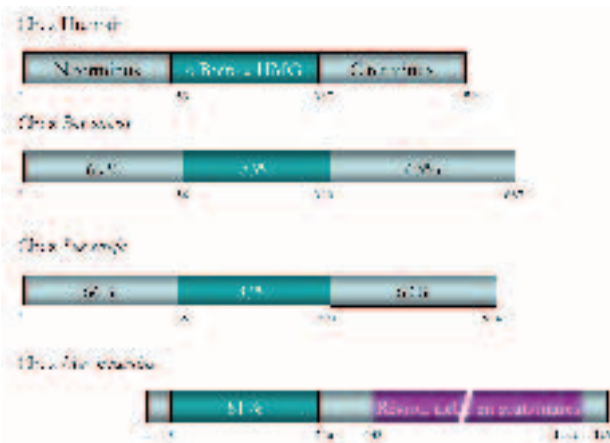


Figure 2 : Structure schématique du gène *SRY* dans différentes espèces de mammifères. Seule la région HMG est très conservée. Chez la souris, la protéine est deux fois plus longue en raison de l'existence d'une vaste région contenant des répétitions de l'acide aminé Glutamine (D'après PANNETIER *et al.*, 2005).

L'intersexualité existe probablement dans toutes les espèces de mammifères (VAIMAN et PAILHOUX, 2000), à des fréquences variables (de l'ordre d'une naissance sur 500, dans l'espèce porcine à une sur 20000, dans l'espèce humaine). Dans la plupart des cas (en tout cas chez l'homme), elle s'explique par des altérations chromosomiques ou moléculaires impliquant *SRY*, en particulier pour les cas de type XX mâle. En effet, dans 80% de ces cas, on identifie des translocations de la région contenant *SRY* sur l'un des chromosomes X. Cet échange chromosomique suffit alors à inverser le sexe phénotypique. Réciproquement, des cas d'individus XY femelles sont expliqués par des mutations des régions importantes de *SRY*, mais dans seulement 20 % des cas (McELREAVEY *et al.*, 1993; HARLEY, CLARKSON et ARGENTARO, 2003).

• LES ENJEUX

L'existence d'inversions sexuelles n'impliquant pas *SRY*, démontre clairement que l'élucidation de la cascade des gènes impliqués dans le déterminisme du sexe ne s'arrêtait pas à la découverte de ce gène, mais au contraire, que d'autres facteurs, encore à découvrir, devaient intervenir. Comme pour *SRY*, l'analyse d'individus mutants, chez lesquels *SRY* n'était pas impliqué, semblait ouvrir une voie très prometteuse. Dans les années 1940, Alfred Jost avait décomposé le déterminisme du sexe en étapes consécutives impliquant un sexe « génétique », déterminé par la présence ou l'absence d'un chromosome sexuel encore inconnu, un sexe hormonal impliquant un facteur aboutissant à la disparition des canaux de Müller (les pièces embryologiques à l'origine du tractus génital femelle), qui fut appelé hormone anti-müllerienne (ou AMH ou MIS ou encore « Jost factor »). Des hypothèses de Jost, il apparaissait que le sexe femelle était le sexe « passif », la voie embryologique où s'engageait le tractus génital en l'absence d'un signal « stop » branchant vers la voie mâle (tableau 1).

Cette hypothèse a été confirmée, dans une certaine mesure, par le fait que l'absence de gonade, provoquée par des gènes très précoces du développement gonadique (WT1, SF1), aboutit à un phénotype femelle. De fait, plusieurs gènes de la

Formules chromosomiques	Génotypes		
	PIS (+/+)	PIS (+/-)	PIS (-/-)
XY	Mâles cornus fertiles	Mâles mottes fertiles plus prolifiques que les mâles PIS (+/+)	Mâles mottes fertiles plus prolifiques que les mâles PIS (+/+) et (+/-). Mâles mottes atteints d'obstruction de l'épididyme : - partiellement (fertiles) - d'une manière généralisée (stériles)
XX	Femelles cornues fertiles	Femelles mottes fertiles plus prolifiques que les femelles PIS (+/+)	Animaux mottes tous stériles, inversés sexuels - 1/2 mâles XX sans ambiguïté; - 1/2 mâles XX avec ambiguïté génitale externe

Tableau 1 : Différents phénotypes des chèvres selon le sexe chromosomique et le génotype PIS.

voie aboutissant au sexe mâle ont été identifiés, mais la question de gènes actifs nécessaires au développement de l'ovaire restait, en l'an 2000, une question pour le moins controversée. Donc, de 1994 à 2000, le tableau des gènes de déterminisme mâle, *SRY* mis à part, commençait à se remplir et ceci, grâce à l'étude d'individus XY femelles, chez qui *SRY* était présent et apparemment correctement régulé. Le facteur probablement le plus important découvert dans cette voie, *SOX9*, le fut à la suite de l'étude d'une maladie génétique humaine rare, la dysplasie campomélique, nanisme impliquant de lourds défauts de la structure et de la croissance cartilagineuse, associée dans trois quarts des cas, à une inversion sexuelle de type XY femelle (FOSTER *et al.*, 1994; WAGNER *et al.*, 1994). Après un long travail de clonage positionnel, ce gène appartenant à la famille de *SRY* et localisé sur le chromosome 17 humain, fut identifié. *SOX9* est beaucoup plus conservé dans l'évolution que *SRY*, puisque son homologue existe aussi chez les oiseaux et les reptiles, au contraire de *SRY*. Plusieurs articles ont démontré l'importance de ce gène dans le déterminisme du sexe mâle de plusieurs classes de Vertébrés. Comme pour *SRY*, sa fonction demeure cependant mal élucidée. En effet, la région promotrice de *SOX9* est l'une des plus vastes décrites dans les catalogues de promoteurs des gènes mammaliens, puisque des éléments régulateurs existent au delà d'un million de bases, en amont du codon d'activation du gène et ceci, chez l'homme et la souris (PFEIFER *et al.*, 1999). Cet état de fait particulier complique considérablement l'identification de régulateurs transcriptionnels de *SOX9*. En aval de ce gène par contre, on trouve le gène de l'AMH, cet acteur clef que nous avons évoqué précédemment.

En regard du décryptage de la cascade mâle aboutissant à l'identification de déterminants des testicules ou du tractus mâle, l'aspect femelle demeurerait relativement vide. L'hypothèse d'Alfred Jost était-elle donc totalement exacte et n'existait-il pas de gènes de la différenciation ovarienne ? L'existence de mammifères intersexués de type XX mâle, ne présentant pas de séquence du chromosome Y, représentait donc une voie privilégiée pour rechercher ce type de facteurs.

Les cas familiaux humains de ce type étant particulièrement rares, l'utilisation de modèles animaux s'imposait. Sous l'impulsion conjointe de Marc Fellous, alors généticien à l'Institut Pasteur et de François Grosclaude, Directeur du secteur « Productions Animales » à l'INRA, un programme de recherche de gènes d'intersexualité XX mâle fut mis en œuvre, au tout début des années 1990, dans deux espèces d'intérêt agronomique, le porc et la chèvre. Nous traiterons de cette espèce dans ce texte.

#### • LES PRÉMISSSES

Ainsi qu'évoqué dans le premier paragraphe, l'intersexualité dans l'espèce caprine a été décrite, il y a maintenant plus de cent ans. Décrivons maintenant un autre phénotype particulier caractéristique de l'espèce caprine (ainsi que d'autres ruminants domestiques tels les bovins), l'absence de corne (caractère « motte » dans la nomenclature française, « polled » dans la littérature anglo-saxonne). Avec le développement de l'enregistrement de pedigrees, il devint possible de rationaliser la sélection animale par l'utilisation dirigée d'individus présentant des phénotypes d'intérêt pour les éleveurs ; l'absence de cornes constitue un caractère d'intérêt pour l'élevage des ruminants, en particulier dans des conditions intensives, où les animaux peuvent se blesser ou blesser les éleveurs. Une mutation sans corne fut décrite au début du siècle, probablement à partir d'un animal provenant d'un élevage suisse. Les éleveurs démontrèrent que le phénotype se transmettait comme un caractère dominant. L'intérêt du phénotype fut tel que le premier animal fut utilisé comme géniteur dans de nombreux pays d'élevage caprin à travers le monde (en Europe de l'Ouest, de l'Est, en Amérique du Sud, aux Etats-Unis, en Israël). Il apparut dans les élevages des anomalies de sex-ratio, avec un excès de mâles ; une proportion relativement élevée de ces mâles était cependant stérile. L'analyse génétique rigoureuse de la transmission de l'intersexualité et de l'absence de cornes fut conclue en 1944 (ASDELL, 1944). Il fut alors démontré que l'absence de cornes se transmettait simulta-



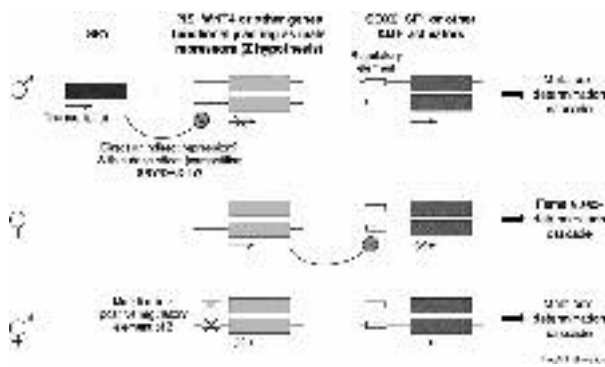


Figure 3 : Transmission de l'intersexualité et de l'absence de cornes chez les chèvres motte.

nément avec une intersexualité de type XX mâle. Le caractère motte se transmettait selon un mode dominant, alors que l'intersexualité se transmettait selon un mode récessif et n'affectait que les femelles (figure 3).

Jusqu'à la mise au point du marquage des chromosomes, un réel progrès de la cytogénétique moderne, le sujet des chèvres sans cornes évolua peu. Une date clef fut probablement la réunion « historique » qui eut lieu à l'INRA de Jouy-en-Josas, à l'été 1969. Au cours de cette réunion, il fut démontré sans ambiguïté que les chèvres intersexuées présentaient bien un caryotype XX, observation renforçant l'analyse génétique des pedigrees qui montrait, par des méthodes classiques de génétique « mendélienne », que le caractère était autosomique. À nouveau, une vingtaine d'années furent nécessaires pour que le sujet prenne un nouveau tournant.

• LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET LES CHÈVRES SANS CORNES

Ainsi qu'évoqué dans le premier paragraphe, un caryotype XX n'exclut pas la présence d'un petit fragment de chromosome Y contenant ce que l'on connaissait alors comme le TDF. L'identification de *SRY* chez l'Homme allait permettre de démontrer sans ambiguïté que les chèvres sans cornes ne contenaient aucune séquence du chromosome Y (PAILHOUX *et al.*, 1994). Par conséquent, leur phénotype était la résultante d'une mutation dans un autre gène. L'enjeu scientifique était de taille, puisque, comme nous l'avions évoqué précédemment, le versant femelle du déterminisme du sexe (en dépit de l'apparition de candidats prometteurs mais révoqués, comme *DAX1*), restait désespérément vide. L'INRA avait débloqué des moyens conséquents pour construire des familles informatives de chèvres sans cornes, en construisant des pedigrees de type back-cross, pedigrees où un mâle hétérozygote sans cornes (P/p) était croisé avec des femelles de phénotype sauvage (cornu, p/p). L'absence de cornes étant un caractère dominant, la moitié de la descendance était cornue et l'autre moitié sans cornes. Ce caractère phénotypique simple pouvait donc être utilisé comme marqueur de l'intersexualité, ce qui constituait un avantage considérable par rapport à d'autres espèces modèles, comme le porc.

La recherche du gène responsable pouvait donc être entre-

prise par des méthodes commençant tout juste à être développées pour les espèces animales, celles de la cartographie génétique et du clonage positionnel. Rappelons en effet que, schématiquement, deux approches peuvent être utilisées pour identifier un gène ; l'une d'elle implique une connaissance biochimique de l'effet physiologique du gène, l'autre consiste à localiser ce gène « cartographiquement » dans un intervalle de plus en plus restreint sur les chromosomes. Comme la fonction biologique des gènes impliqués dans des caractères complexes, tels le déterminisme du sexe ou l'absence de corne, demeure *a priori* largement inconnue, l'approche cartographique est souvent la seule disponible. Cependant, elle nécessite d'une part des familles dites informatives et d'autre part, des outils sophistiqués permettant de réaliser des « tours du génome », ou « genome scan » en anglais. Ces outils sont d'une part des marqueurs génétiques, c'est à dire des séquences d'ADN polymorphes (ayant de nombreux allèles) couvrant l'ensemble du génome et d'autre part, des outils physiques, permettant d'approcher les séquences d'intérêt et de les manipuler aisément. Alors que l'INRA avait entrepris, avec une bonne longueur d'avance, la construction des familles, les outils moléculaires commençaient tout juste à se développer, au niveau mondial, pour l'espèce de ruminants économiquement importante, à savoir, l'espèce bovine. Cependant par chance, nous, et d'autres, avions pu démontrer dès les années 1990 que les microsatellites (marqueurs génétiques par excellence), développés chez les bovins, fonctionnaient chez le mouton ou la chèvre dans une proportion de 35 à 45% (PEPIN *et al.*, 1995). Cette constatation fondamentale allait permettre de lancer un ambitieux programme moléculaire qui aboutit cinq ans plus tard au clonage de la mutation « sans cornes » de la chèvre domestique, ouvrant au passage la voie à une meilleure compréhension de la morphogénèse et du fonctionnement de l'ovaire chez les mammifères.

• UNE HISTOIRE RÉUSSIE DE CLONAGE POSITIONNEL

Le point de départ du programme a consisté à constituer 12 familles de demi-frères/sœurs chez lesquels le caractère « motte » était en ségrégation. Ces familles comportaient un peu moins de 300 descendants (figure 4).

Sans information moléculaire complémentaire, il n'était pas possible de trancher entre plusieurs hypothèses permettant de comprendre l'étonnant déterminisme génétique conjoint de l'intersexualité et de l'absence de cornes des chèvres. L'hypothèse

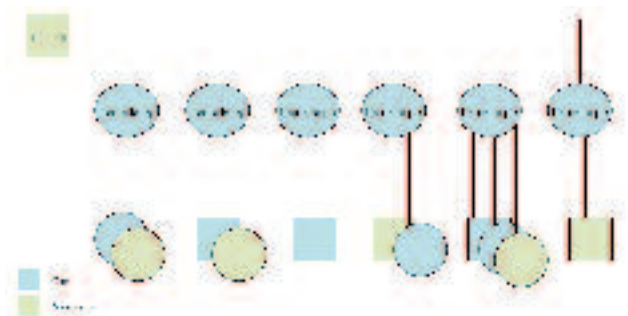
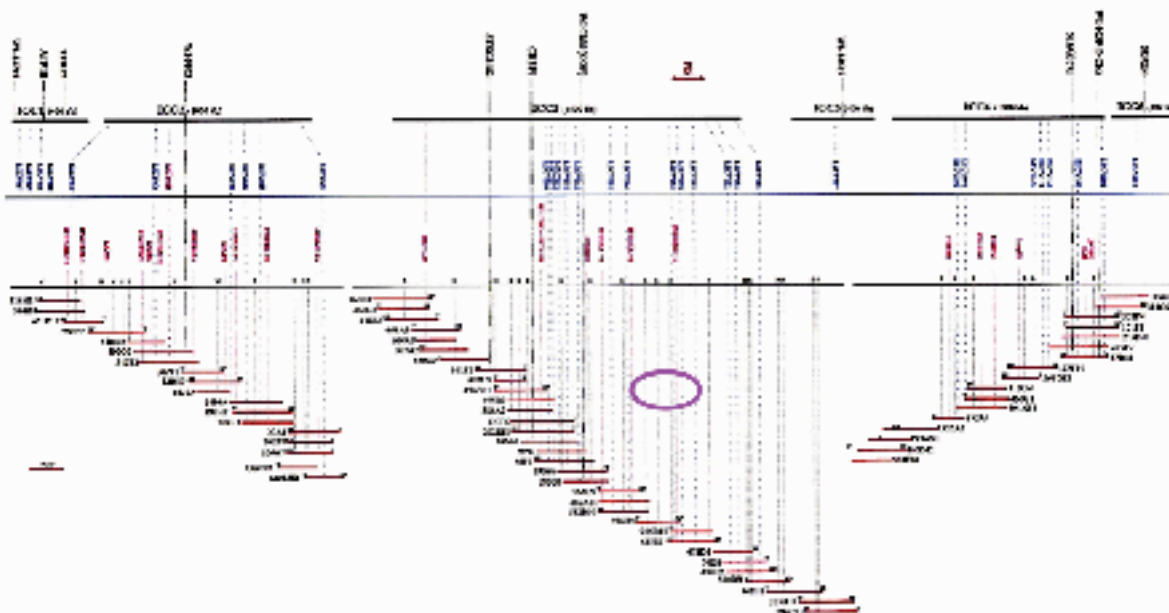


Figure 4 : Exemple de structure de familles créées au cours des années 1990 pour le projet de clonage positionnel.

la plus simple reposait sur l'existence de deux gènes tellement proches qu'ils n'étaient jamais séparés par recombinaison génétique et que la mutation, par exemple une délétion très importante, avait emporté le fragment chromosomique contenant les deux gènes. Un seul gène pouvait aussi avoir un effet pléiotropique expliquant les deux phénotypes, mais en 1990, cela semblait moins probable. Enfin, l'hypothèse impliquant la disparition ou la mutation d'un élément régulateur était tout bonnement loin des modèles de mutation répertoriés à cette période. Nous allions découvrir que la réponse était une combinaison de ces modèles. Nous entreprîmes l'étude de localisation génétique du gène sans-corne avec une batterie de moins de 250 marqueurs bovins conservés dans l'espèce caprine, en position ainsi qu'en polymorphisme. Au début de l'année 1994, aboutirent trois premières localisations de gènes chez les animaux domestiques, toutes chez les bovins. De façon fort intéressante, l'une de ces localisations impliquait le gène sans-corne des bovins (GEORGES *et al.*, 1993). Il fut localisé dans la région centromérique du chromosome 1 bovin. Ce résultat nous incita à cribler tout d'abord des marqueurs de la région homologue caprine, c'est à dire de la région centromérique du chromosome 1. Nous ne pûmes détecter la moindre liaison génétique, ce qui nous conduisit à entreprendre un criblage sur le génome entier. Curieusement, nous découvrimus, avec ironie, la première liaison génétique sur le chromosome 1, mais en position subtélomérique, c'est à dire pratiquement à l'opposé du chromosome (VAIMAN *et al.*, 1996). Ce résultat suggérait que la mutation sans-corne bovine différait de la mutation caprine. Paradoxalement, la recherche du gène bovin n'a toujours pas abouti à l'heure actuelle, contrairement à celle du gène caprin, bien que ce travail ait été pourtant entrepris avec des moyens beaucoup plus restreints. Au cours des quatre années qui suivirent cette « primolocalisation », des efforts furent consacrés à enrichir la compréhension cartographique de la région. Pour ce faire, et grâce à la construction d'une banque de grands fragments chromosomiques (BACs = Bacterial Artificial

Chromosomes) pour l'espèce caprine (SCHIBLER *et al.*, 2000), toutes les techniques disponibles ont été utilisées, en particulier la production de nouveaux microsatellites à partir de chromosomes triés (VAIMAN *et al.*, 1997), grattés (VAIMAN *et al.*, 1999). Ces travaux cartographiques permirent de passer d'une région de 10 centimorgans (environ 10 millions de bases, 100 à 300 gènes) à une région de 1 centimorgan (environ 1 million de bases, 10 à 30 gènes). De surcroît, il fut possible d'affiner considérablement la localisation physique du gène sur le chromosome 1, au niveau de la bande 1q43, à l'aide de la cartographie physique par hybridation de sondes fluorescentes sur chromosomes métaphasiques et surtout, de clarifier la correspondance précise avec la carte humaine. En effet, le chromosome 1 de la chèvre (comme celui du bovin) est constitué d'une succession de fragments orthologues des chromosomes 3 et 21 humains. Du centromère au télomère, on trouve par peinture chromosomique des chromosomes humains sur les chromosomes des ruminants (HAYES, 1995), environ 1/3 du chromosome 21, puis le chromosome 3 et enfin, les 2/3 restants du chromosome 21. Par conséquent, la région qui nous intéressait au plus haut point (1q43) correspondait précisément à une région de cassure, et la première localisation ne permettait aucunement de trancher vers l'un ou l'autre chromosome. A la suite des travaux de cartographie fine, il devint évident que l'homologue humain était porté par le chromosome 3 et non par le 21, plus précisément sur la bande 3q23. Une consultation de la liste des maladies génétiques humaines décrites et localisées en 1999 montrait l'existence d'une seule pathologie humaine localisée précisément sur cette bande, le syndrome dit BPES (Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Syndrome). Ce syndrome complexe présentait un certain nombre de similarités avec la pathologie caprine, ce qui nous incita à discuter la possibilité d'une homologie entre le BPES et la pathologie caprine que nous appelions dorénavant PIS (Polled Intersex Syndrome). Nous reviendrons ultérieurement sur cette pathologie. Nos travaux de clonage positionnel prirent alors une nouvelle orien-



**Figure 5 :** Le contig physique de la région PIS (D'après SCHIBLER *et al.*, 2000). Le BAC (plasmide bactérien contenant un insert d'environ 150 kilobases d'ADN caprin) contenant la mutation PIS est cerclé.

tation : il s'agissait d'établir une succession de grands fragments d'ADN recouvrant la région d'intérêt (ou contigs). Pour ce faire, la banque de BAC fut un outil primordial ; nous réalisâmes une série de quatre contigs, le plus grand comportant plus d'une cinquantaine de BACs et couvrant plus d'un million de bases. Nous avons isolé de façon systématique de nouveaux microsatellites à partir de ces BACs et nous les avons utilisés pour génotyper nos familles informatives (SCHIBLER *et al.*, 2000) (figure 5).

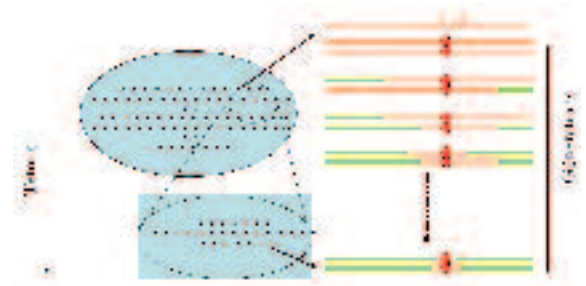
Dès le début du programme, nous formions l'espoir de découvrir un déséquilibre de liaison populationnel dans la fraction réduite (35 individus) d'animaux sans cornes, non apparentés présents dans nos fichiers. La population utilisée présentait une sérieuse chance d'avoir ce genre de déséquilibre (figure 6).

En effet, nous savions qu'historiquement, la mutation avait été introduite par croisement dans les populations caprines à partir d'un nombre d'animaux très réduit, ce qui avait généré une très forte pression de sélection pour l'allèle sans cornes. Par la suite, en raison de ses effets délétères sur le déterminisme du sexe, la pression avait considérablement été relâchée. Par ailleurs, l'introgression<sup>(2)</sup> était relativement ancienne (50 à 100 générations de chèvres), ce qui suggérait que si nous testions de nouveaux marqueurs suffisamment proches, nous allions délimiter la position de la mutation de façon très précise. Ce fut effectivement ce qui se produisit dans la dernière étape du travail (SCHIBLER *et al.*, 2000) : le séquençage partiel du BAC contenant ces marqueurs montra que la mutation était localisée dans un intervalle de 25000 bases d'ADN environ.

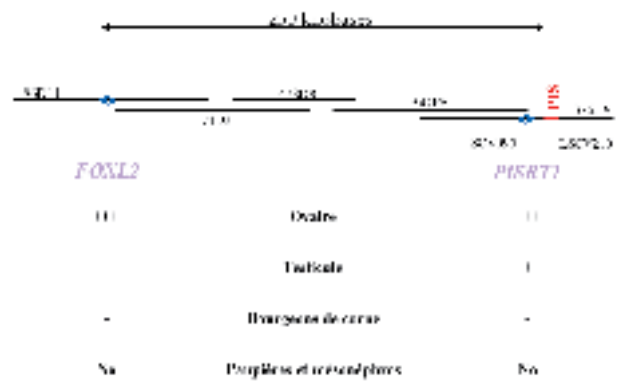
En parallèle, nous décidâmes d'identifier des séquences transcrites dans le BAC d'intérêt. Nous utilisâmes l'approche connue sous le nom d'exon-trapping. Brièvement, cette approche repose sur la constitution d'une banque de fragments d'ADN de grande taille d'une région génomique d'intérêt (environ 5 à 10 kilobases) dans une bactérie, en utilisant un vecteur spécifique permettant l'épissage des séquences génomiques clonées, puis sur la transfection de cette banque dans des cellules eucaryotes. Celles-ci réalisent l'épissage, puis les ARN exogènes sont isolés et analysés. On peut ainsi en théorie identifier expérimentalement les séquences transcrites dans une séquence génomique donnée. Par cette approche, nous pûmes séquencer une cinquantaine de fragments exoniques.

À ce stade, l'impact de l'analyse physiologique des gonades fut déterminant. En effet, nous disposions d'ARN messagers des gonades fœtales, mâles, femelles ou intersexuées, à différentes étapes clés du développement gonadique chez la chèvre, à 36 jpc (jours post-coït), à 40 jpc, 44 jpc, 56 jpc, et à 5 jpp (jour post-partum). Ces ARNm ont été rétrotranscrits et utilisés comme cible de réactions de PCR, pour évaluer la présence d'exons gonadiques dans les exons issus de nos expériences d'exon-trapping. Parmi ces courtes séquences, nous en identifîâmes une de moins de 100 paires de bases, qui présentait un important dimorphisme d'ex-

pression entre les gonades mâles et femelles. Par des techniques moléculaires, nous pûmes démontrer que cette séquence faisait partie d'un transcrit de 1500 paires de bases, que nous nommâmes *PISRT1*, pour PIS-regulated transcript 1. L'analyse de la séquence nous montra que *PISRT1* était localisé à environ 30 kilobases de la région que nous avions déterminée comme porteuse de la mutation. *PISRT1* correspond à un ARN messenger non traduit, car il ne contient pas de cadre ouvert de lecture. Dans les stades précoces du développement gonadique, il est exprimé à un niveau mille fois plus élevé dans les gonades femelles que dans les gonades mâles. Dans les gonades d'individus XX mâles, son niveau d'expression est très faible, comme dans les gonades mâles à partir de 36 jpc. De façon surprenante, nous montrâmes que *PISRT1* est spécifique du testicule chez l'adulte. Sa spécificité tissulaire change donc au cours du développement. L'absence de cadre ouvert de lecture faisait de ce facteur un élément difficile à étudier, car on ne pouvait lui attribuer de domaine protéique connu. Sur le front de l'identification de la mutation, nous obtenions tout juste la séquence des 25 kilobases d'ADN encadrés par les deux mar-



**Figure 6 :** Un déséquilibre de liaison, c'est-à-dire l'existence de fréquences non équilibrées des allèles pour deux loci chromosomiquement proches, s'observe dans des populations ayant subi un goulot d'étranglement. A la suite d'une catastrophe naturelle ou d'une réduction artificielle drastique de la population, les individus se retrouvent en nombre très restreint. Ceux qui portent une mutation récessive ou qui sont atteints, descendent donc tous d'un ou d'un nombre limité d'ancêtre(s) commun(s). Les fragments chromosomiques encadrant le gène responsable sont conservés et identiques chez tous les porteurs, en particulier pour des allèles de marqueurs génétiques avoisinant. L'analyse du déséquilibre permet de se rapprocher d'un locus à des distances physiques inférieures à 50 kilobases.



**Figure 7 :** Les gènes modulés par la mutation PIS en 2001.

(2) On parle d'introgression lorsqu'un caractère phénotypique jugé intéressant est transféré par une série de croisements, accompagnés de sélection, d'une population où il existe dans une population où il n'existe pas.

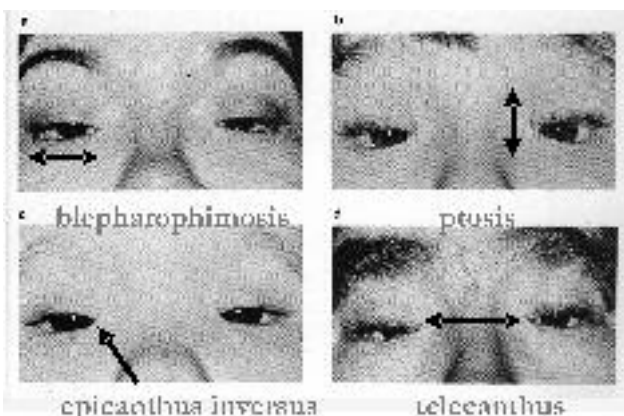


queurs les plus proches de la mutation. En testant de façon systématique, la présence des fragments séquencés chez les individus normaux et intersexués, il nous apparut qu'une série de marqueurs couvrant une douzaine de kilobases étaient absents chez les animaux intersexués. La séquence absente ne présentait aucun gène connu ou inconnu et était, pour l'essentiel, composée de séquences répétées de type LINE (Long Interspersed Elements). La seule particularité que nous ayons notée après une analyse fine de cette séquence, est la possibilité qu'elle avait de produire une boucle d'ADN à l'intérieur d'une jonction de Holliday. La présence de cette boucle devait servir de cible à un facteur inhibiteur chez le mâle, mais non chez la femelle, la fixation du facteur entraînant une répression du gène *PISRT1*, situé à quelques dizaines de kilobases de la mutation. Nous avons dès lors élucidé la cause de l'intersexualité des chèvres sans cornes : la délétion d'un élément d'environ 12 kilobases, élément régulateur de l'expression d'un gène qui devait être un inhibiteur de la fonction testiculaire (figure 7).

La fonction de *PISRT1* demeure fort difficile à approcher ; comprendre comment un ARN non codant peut inhiber la fonction testiculaire reste une question fondamentale, sans précédent avéré. Un éclairage complémentaire allait être fourni, en ce début d'année 2001, par la découverte des mutations causales du BPES.

#### • BPES/PIS POINTS COMMUNS ET DIFFÉRENCES

Comme mentionné précédemment, nous avons hardiment supposé, sans réelle preuve concrète, l'existence d'un lien entre le syndrome BPES humain et le caractère PIS chez la chèvre. Outre les réalités de la cartographie comparée, cette hypothèse reposait aussi sur des considérations physiologiques : le BPES associe, dans une de ses formes (BPES de type I), des anomalies des paupières (figure 8) et une dysfonction ovarienne précoce chez les individus XX.



**Figure 8 :** Le syndrome BPES se caractérise essentiellement par des anomalies de la structure des paupières touchant les deux sexes. Dans le BPES de type I, ces anomalies sont associées à une insuffisance ovarienne prématurée (IOP) des patientes. Ce n'est pas le cas du BPES de type II qui n'affecte que les paupières. Les mutations de *FOXL2* et des régions qui l'entourent sont responsables de la pathologie (CRISPONI et al., 2001 ; De BAERE et al., 2005).

Par conséquent, il existait des similitudes troublantes avec les caprins : les mêmes régions corporelles (sphère céphalique et gonade) étaient atteintes. Il y avait cependant loin d'une pathologie affectant la fonction ovarienne à une inversion sexuelle transformant l'ovaire en testicule. Au début 2001, le gène responsable du BPES était identifié (CRISPONI et al., 2001). Il s'agit d'un facteur transcriptionnel, *FOXL2*, appartenant à la famille des gènes FOX (Forkhead Box factors). Après publication de ces résultats, nous décidâmes d'une part, de localiser physiquement le gène *FOXL2* chez la chèvre et d'autre part, de tester d'apprécier son expression chez les chèvres normales et intersexuées. Par analyse du contig de BACs, nous montrâmes que *FOXL2* était localisé à environ 250 kilobases de la délétion PIS. Son profil d'expression était spécifiquement celui d'un gène ovarien précoce chez la chèvre (expression ovaire spécifique dès 36 jpc) ; à la différence de *PISRT1*, cependant, ce profil d'expression ovarien était conservé pendant toute la vie de l'individu. L'analyse expressionnelle d'individus mutants montra de surcroît que le gène était directement régulé par la mutation PIS. Nous étions donc maintenant en présence de deux gènes corégulés par une même mutation ! Dès ce moment, nous suggérions que les deux gènes pouvaient avoir un effet complémentaire dans la genèse du sexe femelle. *PISRT1* aurait joué le rôle d'un facteur anti-testiculaire et *FOXL2*, celui d'un facteur indispensable au développement et à la physiologie ovarienne. *PISRT1* devenait alors le paradigme du modèle du gène Z, développé, dans les années 1992, pour prendre en compte l'ensemble des cas d'inversions sexuelles XX mâles dans l'espèce humaine (McELREAVEY et al., 1993). Rappelons que dans ce modèle, les gènes clefs du déterminisme sexuel mâle, tels *SOX9*, sont inhibés par un facteur autosomique anti-testiculaire, dans le sexe femelle, ce qui permet le développement ovarien. Nous publiâmes l'ensemble des résultats liant la mutation PIS de la chèvre à l'expression des deux gènes *PISRT1* et *FOXL2* en 2001 (PAILHOUX et al., 2001). Dans le même article, nous analysions l'expression précoce des deux gènes dans les bourgeons de cornes des chèvres et nous démontrions que la même mutation, qui inhibait l'expression dans les gonades, entraînait une forte surexpression dans les bourgeons de corne. Nous expliquions, au passage, la mécanique qui permettait à la même mutation d'avoir un effet récessif dans un organe (les gonades) et un effet dominant dans un autre (les bourgeons de corne, où dans ce cas, la mutation conduit en effet à un gain de fonction).

La fonction réelle des deux gènes demeure cependant à explorer. De ce point de vue, les effets des mutations de *FOXL2* commencent à être connus et de nouvelles approches sont en cours, pour détecter ses cibles et partenaires. Pour *PISRT1*, la tâche demeure ardue. Une étude récente de certains cas de BPES où l'on ne détecte pas de mutation du gène *FOXL2*, suggère chez l'homme, l'existence de mutations distantes de *FOXL2*, qui pourraient avoir un effet similaire à celui de la mutation PIS chez la chèvre. A ce jour, on peut supposer que, chez la femelle, la position des deux gènes dans la cascade est très précoce, semblable à celle de *SOX9* chez le mâle, comblant en partie le vide relatif du schéma que présentait le versant femelle auparavant (figure 9).

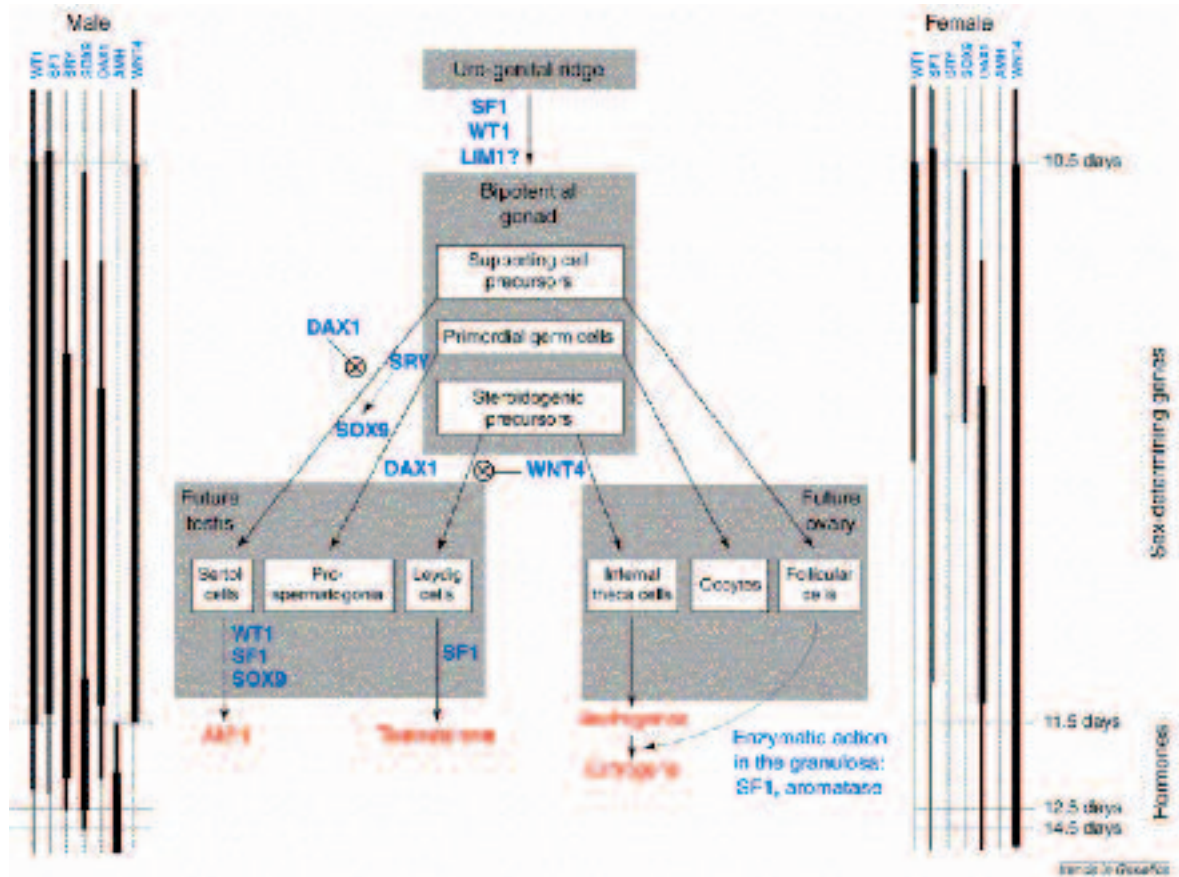


Figure 9 : Une vue simplifiée du déterminisme du sexe gonadique (D'après VAIMAN et PAILHOUS, 2000).

• L'AVENIR DE PIS

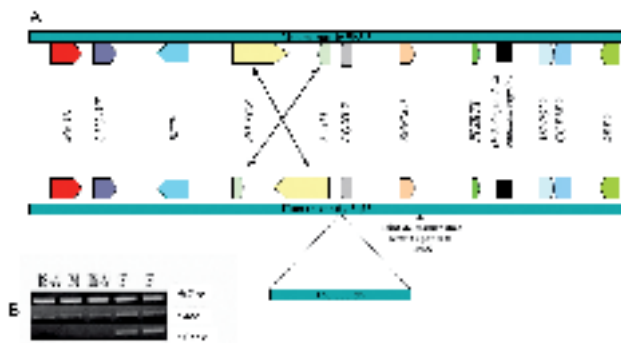
Plusieurs questions restaient et restent encore posées après le clonage positionnel de la mutation PIS. Nous avons commencé à répondre à certaines d'entre elles. Tout d'abord, l'existence d'un effet d'une séquence d'ADN sur des gènes distants, pouvait impliquer que d'autres gènes soient la cible de la mutation. Nous avons en conséquence effectué une analyse systématique de l'expression des gènes situés dans une région d'une mégabase autour de PIS chez la souris et la chèvre. Le gène *FAIM* présentant le plus de similarité d'expression tissulaire avec *FOXL2*, est situé immédiatement à côté de *FOXL2*. *FAIM* est un inhibiteur de l'apoptose, mécanisme biologique d'une très grande importance dans la physiologie ovarienne. Par conséquent, nous avons évalué l'impact de la mutation PIS sur ce gène, et nous avons montré que la mutation n'est pas active sur lui. Par conséquent, l'effet linéaire chromatinien s'arrête après *FOXL2* (NIKIC et VAIMAN, 2004) (figure 10).

En parallèle, chez la chèvre, un gène partageant le promoteur de *FOXL2*, *pFOXC* a été identifié (PANNETIER *et al.*, 2005) (figure 11), de même que des transcrits anti-sens complexes de *FOXL2*, chez l'homme et la souris (COCQUET *et al.*, 2005). Ces transcrits pourraient contribuer à la régulation transcriptionnelle de la région, même s'ils n'ont pas de rôle direct.

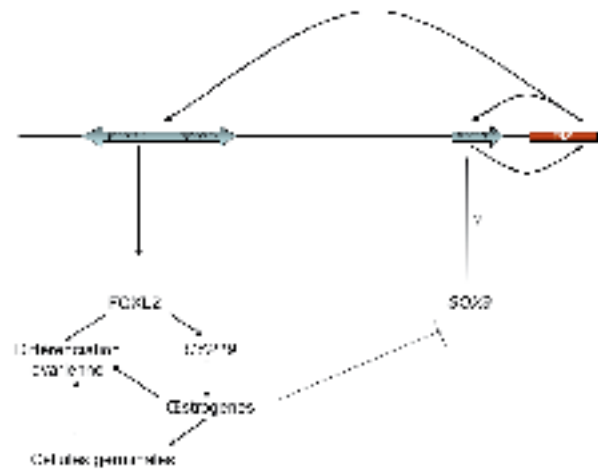
Par ailleurs, l'invalidation ciblée de *FOXL2* a été réalisée chez la souris (SCHMIDT *et al.*, 2004). Comme chez l'Homme, cette expérience génère chez la souris une anomalie précoce de la fonction ovarienne, avec apparemment une prolifération excessive des ovocytes avant 3jpp, ce qui diminue le stock d'ovocytes dans la vie reproductive normale des animaux. Enfin, les souris présentent des anomalies morphologiques marquées des arcades zygomatiques. Ces observations murines vont largement dans le sens où *FOXL2* ne serait pas le gène le plus important dans la différenciation sexuelle, et mettrait encore *PISRT1* sur le devant de la scène.

En conclusion provisoire, nos travaux sur le modèle caprin ont permis de mettre en évidence une région génomique complète qui semble impliquée dans la réalisation du sexe femelle et de la fonction ovarienne. Les familles, réalisées à l'INRA dans d'autres espèces, ont montré que chez le porc, l'intersexualité n'est pas causée par la mutation PIS. L'existence d'autres régions dans d'autres espèces montre que le déterminisme du sexe femelle repose certainement sur plusieurs régions génomiques agissant en concertation. Nous avons clairement ouvert une brèche dans la compréhension de la fonction ovarienne, mais les recherches sur le déterminisme du sexe n'en sont encore qu'à un stade précoce où, si la majorité des acteurs clés sont peut-être connus, leurs interactions demeurent complexes et mal comprises.





**Figure 10 :** A) Les gènes de la région PIS chez la souris et l'Homme (D'après NIKIC et VAIMAN, 2004). B) Les effets de la mutation s'arrêtent à FOXL2 pour l'expression chez la chèvre. En effet, les intersexués et le mâle expriment FAIM dans les gonades en développement, de la même façon que les femelles.



**Figure 11 :** Le locus PIS en 2005 (D'après PANNETIER et al., 2005).

## BIBLIOGRAPHIE

- ASDELL SA (1944) The genetic sex on intersexual goats and a probable linkage with the gene for hornlessness. *Science*, **99**, 124.
- BERTA P, HAWKINS JR, SINCLAIR AH, TAYLOR A, GRIFFITHS BL, GOODFELLOW PN, FELLOUS M (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, **348**, 448-450.
- COCQUET J, PANNETIER M, FELLOUS M, VEITA RA (2005) Sense and antisense Foxl2 transcripts in mouse. *Genomics*, **85**, 531-541.
- CRISPONI L, DEIANA M, LOI A, CHIAPPE F, UDA M, AMATI P, BISCEGLIA L, ZELANTE L, NAGARAJA R, PORCU S, RISTALDI MS, MARZELLA R, ROCCHI M, NICOLINO M, LIENHARDT-ROUSSIE A, NIVELON A, VERLOES A, SCHLESINGER D, GASPARINI P, BONNEAU D, CAO A, PILIA G (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.*, **27**, 159-166.
- DE BAERE E, COPELLI S, CABURET S, LAISSUE P, BEYSEN D, CHRISTIN-MAITRE S, BOUCHARD P, VEITIA R, FELLOUS M. Premature ovarian failure and forkhead transcription factor FOXL2: blepharophimosis-ptosis-epicanthus blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome and ovarian dysfunction. *Pediatr. Endocrinol. Rev.*, 2005 Jun; **2**(4), 653-60.
- FOSTER JW, DOMINGUEZ-STEGELICH MA, GUIOLI S, KOWK G, WELLER PA, STEVANOVIC M, WEISSENBACH J, MANSOUR S, YOUNG ID, GOODFELLOW PN *et al.*, (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, **372**, 525-530.
- GEORGES M., DRINKWATER R, KING T, MISHRA A, MOORE SS, NIELSEN D, SARGEANT LS, SORENSEN A, STEELE MR, ZHAO X *et al.*, (1993) Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in *Bos taurus*. *Nat. Genet.*, **4**, 206-210.
- HARLEY VR, CLARKSON MJ, ARGENTARO A (2003) The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr. Rev.*, **24**, 466-487.
- HAYES H (1995) Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, **71**, 168-174.
- McELREAVEY K., VILAIN E, ABBAS N, HERSKOWITZ I, FELLOUS (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3368-3372.
- NIKIC S, VAIMAN D (2004) Conserved patterns of gene expression in mice and goats in the vicinity of the Polled Intersex Syndrome (PIS) locus. *Chromosome Res.*, **12**, 465-474.
- PAILHOUX E, CRIBIU EP, CHAFFAUX S, DARRE R, FELLOUS M, COTINOT C (1994) Molecular analysis of 60,XX pseudohermaphrodite polled goats for the presence of SRY and ZFY genes. *J. Reprod. Fertil.*, **100**, 491-496.
- PAILHOUX E, VIGIER B, CHAFFAUX S, SERVEL N, TAOURIT S, FURET JP, FELLOUS M, GROSCLAUDE F, CRIBIU EP, COTINOT C, VAIMAN D (2001) A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat. Genet.*, **29**, 453-458.
- 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 a FOXL2 bidirectional promoter. *Genomics*, **85**, 715-726.
- PEPIN L, AMIGUES Y, LEPINGLE A, BERTHIER JL, BENSALIDA, VAIMAN D (1995) Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity*, **74** (Pt 1), 53-61.

- PFEIFER D, KIST R, DEWAR K, DEVON K, LANDER ES, BIRREN B, KORNISZEWSKI L, BACK E, SCHEPHER G (1999) Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to *SOX9*: evidence for an extended control region. *Am. J. Hum. Genet.*, **65**, 111-124.
- SCHIBLER L, CRIBIU EP, OUSTRY-VAIMAN A, FURET JP, VAIMAN D (2000) Fine mapping suggests that the goat Polled Intersex Syndrome and the human Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Syndrome map to a 100-kb homologous region. *Genome Res.*, **10**, 311-318.
- SCHMIDT D, OVITT CE, ANLAG K, FEHSENFELD S, GREDSTED L, TREIER AC, TREIER M (2004) The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, **131**, 933-942.
- VAIMAN D, KOUTITA O, OUSTRY A, ELSEN JM, MANFREDI E, FELLOUS M, CRIBIU EP (1996) Genetic mapping of the autosomal region involved in XX sex-reversal and horn development in goats. *Mamm. Genome*, **7**, 133-137.
- VAIMAN D, PAILHOUX E (2000) Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *Trends Genet.*, **16**, 488-494.
- VAIMAN D, PAILHOUX E, SCHMITZ A, GIRAUD-DELVILLE C, COTINOT C, CRIBIU EP (1997). Mass production of genetic markers from a limited number of sorted chromosomes. *Mamm. Genome*, **8**, 153-156.
- VAIMAN D, SCHIBLER L, OUSTRY-VAIMAN A, PAILHOUX E, GOLDAMMER T, STEVANOVIĆ M, FURET JP, SCHWERIN M, COTINOT C, FELLOUS M, CRIBIU EP (1999) High-resolution human/goat comparative map of the goat polled/intersex syndrome (PIS): the human homologue is contained in a human YAC from HSA3q23. *Genomics*, **56**, 31-39.
- WAGNER T, WIRTH J, MEYER J, ZABEL B, HELD M, ZIMMER J, PASANTES J, BRICARELLI FD, KEUTEL J, HUSTERT E *et al.*, (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*. *Cell*, **79**, 1111-1120.