

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**MÉCANISMES DE RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET DE
L'ACTIVITÉ DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION GATA4**

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE DU

DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

ALAIN BOULENDE SABOUBANGA

Août 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

DÉDICACES

Je rends gloire à Dieu

Qui guide mes pas et continue de me porter dans ses bras.

À ma grande-sœur NADÈGE

J'ai tant à te dire mais ça risque de devenir une thèse concurrente, alors «sora»!

À mes filles Oriana Lezma et Ilena Kristy

Qui je l'espère comprendront et pardonneront un jour mon interminable
absence.

RÉMERCIEMENTS

Au Dr. Nicolas Pilon, mon très cher Directeur

Je me souviens comme hier de ce jour du mois de mai 2009 où je t'ai rencontré la première fois. J'étais en plein désastre intérieur, mais j'avais par curiosité et courtoisie pris la peine de venir à cette entrevue à laquelle tu m'avais convié. Avec tes yeux intelligents, tu as réussi en quelques mots sur GATA4 à me faire chavirer et rallumer la flamme scientifique qui agonisait en moi. Tu motives et inspires tes étudiants en réalisant des expériences avec eux, allant jusqu'à «raquer nos tips». Je n'oublierai jamais!

Au Dr. Robert Viger, mon Co-Directeur

Par ton optimisme contagieux, tu m'as appris à positiver même lorsque nos résultats n'étaient pas le reflet de nos attentes, permettant à cette passion pour GATA4 de ne pas vaciller dans les moments de doute. Tu n'as pas hésité de m'impliquer dans la participation aux congrès du réseau Québécois en reproduction (RQR), aux journées scientifiques du centre de recherche en biologie de la reproduction (CRBR) ainsi qu'à certaines conférences sur GATA4 tenues au CHUL à Québec. J'ai énormément appris de ces rencontres et de tes judicieux conseils.

Alors à tous les deux, je tiens à vous rendre un hommage solennel, mérité et appuyé pour m'avoir encadré, supporté, recadré quand ce fut nécessaire. Vos empreintes dans ma formation resteront indélébiles.

Ma profonde gratitude à Mélanie Béland et Marie-France Bouchard pour l'ensemble des travaux que vous avez piloté brillamment (génération de lignée, Southern blot, qPCR, immuno-histochimie et bien d'autres). Mélanie tu as été pour moi comme un tuteur. Pour toutes ces heures passées à cribler des

clones de cellules souches embryonnaires sous la hotte et tout ton dévouement pour réaliser les Southern, j'aurais aimé que la dernière lignée de souris soit fonctionnelle. Mais ce sont les aléas de la science. Marie-France, toujours professionnelle et motivée, j'ai adoré toutes les discussions sur GATA4 avec toi et d'autres étudiants du CRBR. Cette thèse n'aurait pas avancé sans votre énorme contribution. Je souligne également l'apport de Catherine Brousseau, Ouliana Souchkova et Bruno Prud'homme pour l'accomplissement de ces travaux.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire. Ouf quelle équipe! Avouons que Dr Pilon a le talent d'avoir regroupé dans son labo une team multiculturelle où se côtoie russe, africains, cubaine, chilien-qubécois, mexicain, québécoise et français, donnant à ce laboratoire une ambiance enviée. Oui, que je suis fière d'être un des vôtres. Gravé dans mon cœur seront ces retrouvailles en série à l'animalerie où chacun venait scruter ces «plugs», les fins de semaine sous microscope à chercher des embryons mutés. Et comment passer sous silence ces party de Noël de feu chez notre boss ou au département? Alors un méga spaciba à Oulichka «est-ce que Ouliano est lo?», à Baptiste, muchas gracias à dona Oraly alias No me facha la pipi, bienvenue à Karl roi du hirschsprung, à notre adorable Tatiana du bled Gatineau. Initché à mon dogo Aboubacrine «bonjour tout le monde, vous allez bien?». Oui grâce à toi Abou au labo on fait des manips de dinnnnng. Je ne peux oublier Daniel Aguilera notre mexicain atypique et Guillaume qui a fait le tour du poteau en 80s et n'ont cessé de me «wandayer» chaque jour dans ce labo. Rodolphe merci pour cette fierté française que tu as insufflée sur le labo, encore un coup de maître du boss avec cette recrue nantaise dont l'énergie est dangereuse sur un terrain de basket! Salut à notre bien aimée Émilie, non mais allô quoi une coiffure mauve, nulle n'a osé avant toi, et après toi ce sera juste le KO. Bienvenue à Chloé. J'ai

également une pensée pour tous les stagiaires qui sont passés dans notre labo notamment Isabelle la Doudoune, la french connexion représentée par Marine, Victoria, du coup je n'oublie pas la toute dernière miss Marina alias Cléopâtre.

Remerciements aussi à tous nos collègues et amis du 3^e étage. Palme d'or au labo Averill qui finalement est comme une extension du notre, on se comprend. Marceline merci pour ta précieuse Amitié; Mélanie au pluriel, Audrey merci de votre générosité. Mes respects à tous les Doctorants ou futurs du 3^e étage, la très puissante Ouafa, Fadilla, Louis-Charles, Cyndhia, Cynthia, Évemie, Amine, le tout puissant Gatien. Le parcours doctoral n'est pas un long fleuve tranquille mais grâce à vous tous, votre humour, vos sourires et nos games de basket, m'ont permis de voir la science en rose.

Sincères remerciements à tous nos techniciens de laboratoire qui se démènent pour nous faciliter la vie. Mention spéciale à Luc Charrest, je voulais dire Dubé et à André Gervais ma pauline Marois, ils se reconnaîtront dans cette ultime honneur. Merci également à toutes les secrétaires du département qui veillent sur nous et apaise nos angoisses.

À nos valeureux animaliers, je reconnais votre travail colossal. Merci d'avoir rendu agréables tous nos va et vient de l'animalerie. Vraiment nos animaux ont de la chance d'avoir la famille Tinkiwinki Normand, Angèle Luc et Sandy. J'ai beaucoup appris de vous. Un hommage distingué à la famille Boulende que je porte dans mon cœur.

Merci à mes grands frères et ami Blaise Wada, Viannet Okouma pour votre soutien sans faille; à ma cousine Cynthia et sa famille; à tonton Any et la famille Caesar; à mon ami Ruphin pour tous nos souvenirs communs depuis Moanda jusqu'au Canada; Gérard Bouyela et famille; à Mahinè et Jeremy compagnons de lutte depuis la ville de Québec; à mon cousin Réal qui m'a facilité l'intégration au Québec et pour ses encouragements; à Arsène, maman

Betty et famille. Je rends un vibrant Alléluia au Chœur de Jérusalem, ma chorale, mon autre famille. Enfin, je m'adresse aux plus importants pour moi c'est à dire tous ceux que je n'ai pas cités mais qui m'ont accompagné durant de longues années, soyez en bénis pour votre contribution dans l'édification de ma personnalité.

AVANT-PROPOS

Cette thèse est présentée selon le modèle classique qui à mon avis ressort mieux tout le travail effectué durant ces 5 années, les bons coups et ce qui n'a pas fonctionné. La structure de cette thèse s'articule autour de quatre chapitres. Les chapitres Résultats et Discussion (III et IV) sont chacun subdivisé en deux parties. La première partie intitulée RÔLE ENDOGÈNE DU MOTIF EBOX DANS LA TRANSCRIPTION DE *GATA4* résume les travaux sur l'étude de l'expression gonadique de *GATA4* qui a nécessité la génération et la caractérisation de la lignée de souris *Gata4^{EboxKO}*. Les résultats de cette étude ont été publiés dans PLoS One 2011; 6:e29038. La seconde partie consacrée à CARACTÉRISATION DU RÔLE DES SITES DE PHOSPHORYLATION S105 ET S261 SUR LA FONCTION DE LA PROTÉINE GATA4 CHEZ LA SOURIS exigeait la génération et la caractérisation de deux lignées knock-in *Gata4^{S105A}* et *Gata4^{S261A}*. Les résultats obtenus avec la lignée *Gata4^{S105A}* et consignés dans cette thèse sont l'objet d'un article dont nous finalisons les détails.

Tout le travail décrit dans cette thèse est le fruit de la parfaite collaboration entre les laboratoires des Dr Nicolas Pilon du Centre de recherches biomédicales (BIOMED/UQAM/Montréal) et Robert Viger du Centre de recherche en biologie de la reproduction de l'Université Laval. J'ai mené avec Dre Mélanie Béland la réalisation des expériences du côté de l'UQAM tandis qu'à Québec, les expériences ont été réalisées avec la participation du Dre Marie-France Bouchard et Madame Catherine Brousseau.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACES	ii
RÉMERCIEMENTS	iii
AVANT-PROPOS	vii
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES TABLEAUX	xviii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xix
RÉSUMÉ	xxi
ABSTRACT	xxiii
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION	1
ÉTATS DES CONNAISSANCES	1
I-L'INFERTILITÉ ET SES CAUSES	1
II- ORGANISATION PHYSIOLOGIQUE D'UNE GONADE	2
2.1 Formation de la crête génitale	2
2.2 Histologie et formation du testicule	5
2.2.1 Les spermatogonies	5
2.2.2 Les cellules de Sertoli	6
2.2.3 Les cellules de Leydig	7
2.3 Histologie et formation de l'ovaire	10
2.3.1 Les ovogonies	11
2.3.2 Les cellules de la granulosa	13
2.3.3 Les cellules de la thèque interne	13

III- CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DE LA DÉTERMINATION DU SEXE	16
3.1 Le développement gonadique	16
3.2 Détermination et différenciation de la voie mâle	16
3.3 Gènes clé pour la différenciation des cellules de Sertoli et Leydig	17
3.3.1 SRY	17
3.3.2 SF1	20
3.3.3 WT1	21
3.3.4 FGF9	23
3.3.5 DMRT1	23
3.3.6 DAX1	24
3.3.7 SOX9	26
3.3.8 AMH	27
3.4 Détermination et différenciation de la voie femelle	27
3.5 Gènes clés de la différenciation des cellules somatiques femelles	39
3.5.1 WNT4	30
3.5.2 RSPO1	30
3.5.3 FOXL2	31
3.5.4 FST	33
IV- LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GATA	34
4.1 Les facteurs GATA chez les vertébrés	34
4.2 Organisation structurale et fonctionnelle de la protéine GATA4	36
4.3 Importance des gènes GATA	37
4.4 Les GATA exprimés dans les gonades	38
V- RÔLE DE GATA4 DANS LA DÉTERMINATION DU SEXE ET LE DÉVELOPPEMENT DES GONADES	40
5.1 Interaction des protéines GATA et FOG	40
5.2 Rôle de GATA4-FOG2 dans la détermination du sexe	41
5.3 GATA4-FOG2 dans la différenciation de la voie mâle	42
5.4 GATA4-FOG2 dans la différenciation de la voie femelle	43
5.5 Devenir de FOG2 après la détermination du sexe	44
VI- RÔLE DE GATA4 DANS LA STÉROÏDOGÈNESE	45
6.1 Déroulement de la stéroïdogénèse	45
6.2 Stéroïdogénèse dans les testicules	46
6.3 Stéroïdogénèse dans les ovaires	47

6.4 GATA4 et stéroïdogénèse	48
6.5 Régulation de la stéroïdogénèse	51
VII- EXPRESSION ET ACTIVITÉ DU FACTEUR GATA4 DANS LES GONADES	54
7.1 Régulation de l'expression de <i>Gata4</i>	54
7.2 Le motif E-box	56
7.3 Les protéines USF	60
VIII- RÉGULATION POST-TRADUCTIONNELLE DE LA PROTÉINE GATA4	61
8.1 Acétylation	61
8.2 Ubiquitination	62
8.3 Sumoylation	63
8.4 Phosphorylation	65
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET	68
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES	70
2.1 Génération des modèles d'étude <i>in vivo</i>	70
2.1.1 Ciblage génétique et génération des lignées <i>Gata4</i> ^{EboxKO-Neo} et <i>Gata4</i> ^{EboxKO}	70
2.1.2 Génération de la lignée <i>Gata4</i> ^{S261A}	73
2.2 Cultures cellulaires	77
2.2.1 Protocole de préparation des MEFs	77
2.2.2 Mise en culture des MEFs	77
2.2.3 Inactivation des MEFs à la mitomycine	78
2.2.4 Culture de cellules souches embryonnaires	78
2.2.5 Électroporation des cellules souches embryonnaires	79
2.2.6 Sélection des clones par résistance au G418	79
2.2.7 Préparation de l'ADN des cellules ES pour analyse de type Southern blot	80
2.2.8 Essais de type Southern blot	80
2.2.9 Culture d'autres lignées cellulaires	81
2.3 Collecte des tissus et analyses qPCR	81
2.4 Préparation de coupes histologiques	84
2.5. Immuno-histochimie	85
2.5.1 Immuno-histochimie sur sections	85

2.5.2 Immuno-histochimie sur embryons entiers	86
2.6 Extraction de protéines nucléaires pour essai de type Western blot et de protéomique	88
2.6.1 Essais de type Western blot	89
2.6.2 Essais de protéomique	90
2.7 Collecte de sérum et quantification hormonale	92
2.8 Essais ELISA	93
2.9 Évaluation de la fertilité	94
2.10 Décompte spermatique	95
 CHAPITRE III : RÉSULTATS	 96
 I- RÔLE ENDOGÈNE DU MOTIF EBOX DANS LA TRANSCRIPTION DE <i>GATA4</i>	 96
 3.1 Le croisement de souris possédant la mutation Ebox du promoteur <i>Gata4</i> 1a mais ayant conservé la cassette de sélection Neo ne génère pas d'homozygotes	 96
3.2 Une souris possédant la mutation Ebox du promoteur <i>Gata4</i> 1a mais conservant la cassette de sélection Neo conduit à une mortalité embryonnaire	98
3.3 Le motif Ebox est un élément régulateur spécifique et essentiel pour la transcription à partir de l'exon E1a du gène <i>Gata4</i> <i>in vivo</i>	101
3.3.1 Effet de la mutation dans les gonades	101
3.3.2 Effet de la mutation Ebox dans les tissus extra-gonadiques	104
3.4 Une forte réduction de l'expression du transcrit <i>Gata4</i> E1a n'entraîne pas de phénotype manifeste dans les gonades	106
3.5 La forte réduction de l'expression du transcrit E1a de <i>Gata4</i> n'affecte pas l'expression de la protéine GATA4	110
3.6 Caractérisation des facteurs nucléaires liant le motif E-box du promoteur <i>Gata4</i> 1a	114
 II- Caractérisation du rôle des sites de phosphorylation S105 et S261 sur la fonction de la protéine GATA4 chez la souris	 120
 A- Génération et caractérisation de la lignée <i>Gata4</i> ^{S105A}	 120
3.7 Les souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S105A} se reproduisent normalement	120
3.8 La mutation S105A de GATA4 affecte la taille des gonades et des tissus reproducteurs accessoires	121

3.9 Les niveaux sériques des hormones testostérone et LH sont altérés chez les souris mâles <i>Gata4</i> ^{S105A}	125
3.10 La mutation S105A de GATA4 n'affecte pas la morphologie des gonades	126
3.11 La mutation GATA4 S105 affecte l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie stéroïdogénique du testicule	131
3.12 La réduction de l'expression de plusieurs gènes stéroïdogeniques induite par la mutation S105A est associée à une diminution de l'expression des protéines correspondantes	135
3.13 La mutation S105A n'affecte pas la production de spermatozoïdes chez les souris <i>Gata4</i> ^{S105A}	136
 B- Génération et caractérisation de la lignée <i>Gata4</i> ^{S261A}	143
3.14 Stratégie de construction utilisée	143
3.15 Les souris hétérozygotes <i>Gata4</i> ^{S261A} se reproduisent normalement mais ne respectent pas le ratio mendélien	144
3.16 L'absence des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S261A} n'est pas liée à une mortalité embryonnaire	148
3.17 Alternatives utilisées pour trouver des souris <i>Gata4</i> ^{S261A} homozygotes	149
 CHAPITRE IV : DISCUSSION	151
 I- RÔLE ENDOGÈNE DU MOTIF EBOX DANS LA TRANSCRIPTION DE <i>GATA4</i>	151
4.1 L'insertion de la cassette Neo a conduit à la génération d'un allèle <i>Gata4</i> hypomorphique sévère	151
4.2 Le transcrit E1b assure la production efficace de la protéine GATA4	152
4.3 La traduction du transcrit E1b est favorisée uniquement dans certaines conditions	154
4.4 Le recours au transcrit E1b est accentuée au stade embryonnaire	155
4.5 Identification des partenaires d'interaction du motif Ebox	156
 II- Caractérisation du rôle des sites de phosphorylation S105 et S261 sur la fonction de la protéine GATA4 chez la souris	160
4.6 La mutation GATA4 S105A altère les niveaux sériques de la testostérone, de la LH et affecte la taille des tissus reproducteurs	160

4.7 La mutation GATA4 S105A cause une réduction significative de la stéroïdogénèse au stade adulte sans abolir la fertilité	161
4.8 La mutation GATA4 S105A altère le programme de stéroïdogénèse dans les testicules adultes	163
4.9 Le déficit de testostérone et des enzymes stéroïdogéniques chez les souris <i>Gata4</i> ^{S10A} n'est pas lié à un changement de structure de la protéine GATA4	164
4.10 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas la stéroïdogénèse aux stades précoces	165
4.11 Comment expliquer que la sérine 105 qui n'est pas une cible de PKA affecte la stéroïdogénèse?	165
4.12 La lignée <i>Gata4</i> ^{S261A} n'exprime pas le transgène au bon endroit	167
CONCLUSION GÉNÉRALE	169
ANNEXE: Publication scientifique	173
BIBLIOGRAPHIE	175

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I	Page
Figure 1.1 Formation de la crête génitale et détermination du sexe	4
Figure 1.2 Organisation cellulaire au cours de la différenciation des testicules chez la souris	9
Figure 1.3 Morphogenèse de l'ovaire fœtal chez la souris	12
Figure 1.4 Physiologie de l'ovaire au stade post-natal	14
Figure 1.5 Structure et fonction de la protéine SRY	19
Figure 1.6 Cascade moléculaire de la détermination et la différenciation du sexe chez la souris	28
Figure 1.7 Gènes impliqués dans la détermination du sexe et la différenciation des gonades	33
Figure 1.8 Structure et homologie des protéines GATA chez les vertébrés	35
Figure 1.9 Structure de GATA4 chez la souris	37
Figure 1.10 Principales voies de la stéroïdogénèse dans les gonades	50
Figure 1.11 Régulation simplifiée de la stéroïdogénèse dans les gonades	53
Figure 1.12 Organisation génomique de <i>GATA4</i>	56
Figure 1.13 Mécanisme proposé pour la régulation de la transcription du gène <i>Gata4</i>	57
Figure 1.14 Alignement des séquences des promoteurs proximal 1a et distal 1b de <i>Gata4</i> chez différentes espèces	59
Figure 1.15 Mécanismes de signalisation intracellulaire dans la régulation de l'activité de GATA4 dans les cellules gonadiques	67
 CHAPITRE II	
Figure 2.1 Schéma montrant le vecteur de ciblage	71
Figure 2.2 Ciblage du motif Ebox en amont de l'exon 1a du promoteur <i>Gata4</i> chez la souris	72
Figure 2.3 Ciblage de la sérine S261 de GATA4 chez la souris	75
Figure 2.4 Stratégie globale récapitulant les différentes étapes d'obtention des lignées <i>Gata4</i> homozygotes caractérisées	76
Figure 2.5 Stratégie de ciblage utilisée pour générer la lignée <i>Gata4</i> ^{S105A}	76

Figure 2.6 Stratégie utilisée pour l'identification des facteurs se liant au motif Ebox du promoteur proximal de <i>Gata4</i> dans les gonades à différents stades de développement	93
---	----

CHAPITRE III

Figure 3.1 Vérification de l'évènement de recombinaison dans les clones EboxKO de cellules souches embryonnaires sélectionnés	98
Figure 3.2 Létalité embryonnaire des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{EboxKO-Neo}	100
Figure 3.3 Schéma résumant la stratégie de retrait de la cassette Neo pour l'obtention des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{EboxKO}	100
Figure 3.4 Comparaison des niveaux d'expression des transcrits E1a et E1b dans les gonades provenant des souris de type sauvage (WT) et homozygotes <i>Gata4</i> ^{EboxKO}	103
Figure 3.5 Effet d'une mutation du motif Ebox du promoteur <i>Gata4</i> 1a sur l'expression des transcrits E1a et E1b dans les tissus extra-gonadiques	105
Figure 3.6 La mutation du motif Ebox n'affecte pas la morphologie des testicules des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{EboxKO}	108
Figure 3.7 La mutation du motif Ebox n'affecte pas la morphologie des ovaires des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{EboxKO}	109
Figure 3.8 La mutation Ebox n'affecte pas l'expression de la protéine GATA4 dans les testicules des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{EboxKO}	112
Figure 3.9 La mutation Ebox n'affecte pas l'expression de la protéine GATA4 dans les ovaires des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{EboxKO}	113
Figure 3.10 Isolation et identification des facteurs liant le motif Ebox du promoteur 1a de <i>Gata4</i> dans les gonades	116
Figure 3.11 Isolation et identification des facteurs liant le motif Ebox du promoteur 1a de <i>Gata4</i> dans les cellules de Sertoli	119
Figure 3.12 La mutation S105A provoque une altération dans le poids de plusieurs organes du système reproducteur masculin	124
Figure 3.13 La mutation S105A affecte le niveau circulant des hormones testostérone et LH chez les souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S105A}	127

Figure 3.14 La mutation S105A n'affecte pas la morphologie des testicules des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S105A}	129
Figure 3.15 La mutation S105A n'affecte pas la morphologie des ovaires des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S105A}	130
Figure 3.16 Schéma illustrant l'ordre des différentes enzymes de la voie stéroïdogénique dans les testicules	132
Figure 3.17 La mutation GATA4 S105A conduit à une baisse de l'expression de gènes impliqués dans la voie stéroïdogénique dans les testicules	133
Figure 3.18 Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la voie stéroïdogénique dans les ovaires de souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S105A} au stade adulte	134
Figure 3.19 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas l'expression des marqueurs stéroïdogéniques dans les testicules des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S105A} au stade embryonnaire	138
Figure 3.20 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas l'expression des marqueurs stéroïdogéniques dans les testicules des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S105A} au stade prépubère	139
Figure 3.21 La mutation GATA4 S105A affecte l'expression des marqueurs stéroïdogéniques dans les testicules des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S105A} au stade adulte	141
Figure 3.22 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas l'expression des marqueurs des cellules de Leydig au stade adulte	142
Figure 3.23 Vérification de l'évènement de recombinaison dans les clones S261A de cellules souches embryonnaires sélectionnés	144
Figure 3.24 Détection de la GFP dans les gonades des souris <i>Gata4</i> ^{S261A} hétérozygotes	146
Figure 3.25 Vérification par Western blot de la présence du transgène GATA4 S261A dans les gonades de souris <i>Gata4</i> ^{S261A} hétérozygotes	147
Figure 3.26 Génotypage des souris <i>Gata4</i> ^{S261A} suite au changement d'oligos	149
Figure 3.27 Détection de GFP dans les gonades des souris homozygotes <i>Gata4</i> ^{S261A}	150

CHAPITRE IV

Figure 4.1 Aperçu de la technique du mono hybride en système de levure pour l'identification des partenaires de liaisons du motif Ebox de GATA4	159
Figure 4.2 Voie simplifiée de synthèse de la testostérone dans les cellules de Leydig	163

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I	Page
Tableau 1.1 Gènes impliqués dans la détermination et la différenciation du sexe (liste non exhaustive) chez la souris	32
 CHAPITRE II	
Tableau 2.1 Oligonucléotides utilisés pour l'analyse des souris <i>Gata4^{EboxKO}</i>	83
Tableau 2.2 Oligonucléotides utilisés pour l'analyse des souris <i>Gata4^{S105A}</i>	84
Tableau 2.3 Anticorps utilisés pour l'immuno-histochimie sur les gonades des souris <i>Gata4^{S105A/S105A}</i>	87
Tableau 2.4 Anticorps utilisés pour les essais de type Western blot	90
Tableau 2.5 Séquences des oligonucléotides utilisés pour capter les protéines nucléaires qui pourraient se lier au motif Ebox	92
 CHAPITRE III	
Tableau 3.1 Test de fertilité pour les souris <i>Gata4^{EboxKO}</i>	101
Tableau 3.2 Analyse spectrométrique de la bande éluée à partir d'extraits de testicules après digestion trypsique	107
Tableau 3.3 Analyse spectrométrique des bandes éluées à partir d'extraits d'ovaires après digestion trypsique	118
Tableau 3.4 Tests de fertilité pour les souris <i>Gata4^{S105A}</i>	122
Tableau 3.5 Comparaison du poids des ovaires entre les souris de type sauvage et homozygotes <i>Gata4^{S105A}</i>	125
Tableau 3.6 Décompte spermatique réalisé à partir d'un morceau d'épididyme prélevé sur des souris de type sauvage et <i>Gata4^{S105A}</i> au stade adulte	137
Tableau 3.7 Récapitulatif de l'investigation sur la présence des embryons Homozygotes <i>Gata4^{S261A} in utero</i>	148

LISTE DES ABRÉVIATIONS

17 β HSD	17 bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase
3 β HSD	3 bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMH	Hormone anti-mullerienne
AMPc	Adénosyne monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CREB	<i>cAMP-responsive element binding protein</i>
DAX1	<i>Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1</i>
DHT	Dihydrotestostérone
DMEM	<i>Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium</i>
DMRT1	<i>Doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E15,5	Jour embryonnaire 15,5
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
Emx2	<i>Empty spiracles homeobox 2</i>
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	Sérum foetal bovin
FGF9	<i>Fibroblast grown factor 9</i>
FGFR2	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>
FOG	<i>Friend of GATA</i>
FOXL2	<i>Forkhead box L2</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante
FST	Follistatine
GnRH	<i>Gonadotropin releasing hormone</i>
IgG	Immunoglobuline G
INSL3	<i>Insulin-like grown factor 3</i>
KDa	Kilodalton
LH	Hormone lutéinisante
Lhx9	<i>Lim homeobox protein 9</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
ng	Nanogramme
NR5A1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 5, groupe A, membre 1</i>
P14	Jour postnatal 14
PBS	Tampon phosphate salin
PGC	Cellules germinales primordiales
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
RpL19	Protéine ribosomale L19
RSPO1	R-spondin-1
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SF1	<i>Steroidogenic factor-1</i>
SOX9	<i>SRY-box containing gene 9</i>
SRD5A1	<i>Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1</i>
SRY	<i>Sex-determining region on the Y chromosome</i>
STAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
WNT4	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>
WT1	<i>Wilms tumor, gene 1</i>

RÉSUMÉ

GATA4 est un facteur de transcription conservé au cours de l'évolution qui agit comme un régulateur clé pour le développement et la fonction de plusieurs organes dont les gonades. Chez les mammifères, l'expression de GATA4 est proéminente dans les cellules somatiques des gonades des deux sexes. La génération de différents modèles de souris, incluant les souris transgéniques exprimant soit une forme mutante de GATA4 ou un allèle *Gata4* knock-out conditionnel dans les gonades, a confirmé le rôle essentiel de ce facteur dans le développement précoce des gonades ainsi que pour la fertilité des deux sexes au stade adulte.

En dépit de ce rôle crucial au cours de la reproduction, les connaissances sur les mécanismes de régulation de l'expression de GATA4 et son activité demeurent limitées. Nous avons précédemment mis en évidence un mode d'épissage alternatif pour *GATA4* et identifié que chez les humains et les rongeurs, *GATA4* est exprimé sous forme de multiples transcrits qui diffèrent selon leur premier exon. Parmi ceux-ci, deux exons seulement sont conservés à travers différentes espèces : l'exon proximal *Gata4* 1a et distal 1b. Ces transcrits E1a et E1b sont co-exprimés dans tous les tissus exprimant GATA4 et sont générés à partir de deux promoteurs distincts, régulés indépendamment. Malgré cette différence dans leur origine 5', chacun des transcrits E1a et 1b est efficacement traduit et concourt à la production d'une protéine GATA4 à des niveaux similaires. Nos travaux *in vitro* ont antérieurement démontré qu'un motif Ebox conservé, localisé en amont de l'exon 1a est important pour l'expression de *Gata4* dans les gonades. Concernant la fonction de GATA4, d'autres études *in vitro* et *in vivo* ont confirmé que sa phosphorylation via le résidu sérine 105 est cruciale pour l'activité de la protéine dans les cellules cardiaques. Cependant, l'importance de ce résidu sérine 105 dans la fonction gonadique de GATA4 n'est pas connue.

La létalité embryonnaire précoce observée chez les souris invalidées pour le gène *Gata4*, a freiné pendant longtemps l'exploration *in vivo* des mécanismes de régulation de l'expression de *GATA4*. L'utilisation de plusieurs modèles de souris présentant un allèle *Gata4* hypomorphique a depuis lors amélioré les connaissances sur le rôle de *Gata4* dans la différenciation et la fonction des gonades. C'est dans cette optique, que nous avons généré la lignée *Gata4*^{EboxKO} pour étudier l'importance du motif Ebox dans l'expression de *Gata4*. La mutation du motif Ebox conduit à une diminution marquée et spécifique de l'expression des transcrits *Gata4* E1a dans les gonades et dans plusieurs autres tissus qui expriment GATA4, à différents stades du

développement. Le motif Ebox est donc essentiel pour l'expression du transcrit 1a. Toutefois, l'expression du transcrit 1b n'est pas affectée et augmentent même dans les gonades au stade embryonnaire, suggérant que ce transcrit serait favorisé au cours de la traduction pour compenser la diminution du transcrit 1a. Ceci explique l'absence d'un phénotype physiologique vu que la protéine GATA4 est toujours présente.

Nous avons dans un second temps caractérisé une lignée de souris mutée *Gata4*^{S105A} afin de déterminer l'importance du résidu sérine 105 dans la fonction gonadique de GATA4. Les résultats montrent que la mutation GATA4 S105A est associée à une modification notable de la taille des tissus reproducteurs dépendant des androgènes, et entraîne une diminution significative du niveau de testostérone chez les souris mâles adultes qui demeurent toutefois fertiles. De façon convaincante, nos travaux ont révélé que cette baisse du niveau de testostérone corrèle avec une diminution remarquable de l'expression des protéines et enzymes impliquées dans le processus de stéroïdogénèse menant à la synthèse de testostérone. Enfin, nos résultats suggèrent également que la stéroïdogénèse anormale chez les mutants *Gata4*^{S105A} n'est pas liée à un défaut de différenciation des cellules de Leydig mais provient plutôt d'une altération spécifique du programme de stéroïdogénèse elle-même induite par la mutation GATA4 S105A.

En conclusion, les résultats présentés dans cette thèse confirment le rôle critique de l'élément Ebox proximal pour l'expression du transcrit 1a de *GATA4* et attestent pour la première fois que la phosphorylation de la sérine 105 de GATA4 est nécessaire *in vivo* pour une stéroïdogénèse appropriée chez les mâles.

MOTS-CLÉS: *Gata4*, régulation de gènes, Ebox, transcrits alternatifs, testicule, ovaire, cellules de Leydig, stéroïdogénèse, enzymes stéroïdogéniques, testostérone.

ABSTRACT

GATA4 is an evolutionary conserved transcription factor that acts as a key regulator required for the development and function of several organs, including the gonads. In mammals, GATA4 expression is prominent in the somatic cells of the gonads of both sexes. The generation of various mouse models, including transgenic mice expressing a mutant form of GATA4 or a *Gata4* conditional knockout allele in the gonads, confirmed the essential role of this factor in early gonadal development and fertility of both sexes. Despite this crucial role in reproductive tissues, knowledge of the mechanisms regulating GATA4 expression and its activity remains limited.

We have previously demonstrated a mode of alternative splicing for *GATA4* and identified in humans and rodents that *GATA4* is expressed as multiple transcripts that differ according to their first exon. Among these non-coding first exons, only two are conserved across different species, the proximal *Gata4* 1a and the distal 1b exon. These two transcripts 1a and 1b were found to be co-expressed in all GATA4-expressing tissues and are generated from two different promoters, regulated independently. Despite this difference in their 5' origin, each of the two transcripts is effectively translated and contributes to the production of the same GATA4 protein.

Our *in vitro* studies have shown that a previously evolutionary conserved Ebox element (CACGTG), located upstream of exon 1a is important for expression of *GATA4* in the gonads. Regarding the function of GATA4, *in vitro* and *in vivo* studies have confirmed that phosphorylation via the serine 105 is critical to the activity of the protein in cardiac cells. However, the importance of this serine residue in GATA4 gonadal function is not known.

Early embryonic lethality observed in *Gata4* knock-out mice limited for a long time the *in vivo* exploration of the mechanisms regulating GATA4 expression. The use of several mice models with a hypomorphic *Gata4* allele has since improved knowledge on the role of GATA4 in gonad differentiation and function. It is in this context that we generated the *Gata4*^{EboxKO} line to study the importance of the Ebox element in *Gata4* expression. The Ebox mutation led to a marked and specific reduction of E1a transcript expression in gonads and several other tissues that express GATA4, at different stages of development. The Ebox motif is essential for expression of the 1a transcript. However, expression of the 1b transcript is not affected and even increases in embryonic gonads, suggesting that this transcript would be promoted during translation to compensate for the decrease of the 1a transcript. This explains the absence of a physiological phenotype since GATA4 protein is still present.

In a second step, we have characterized a *Gata4*^{S105A} knock-in line to determine the importance of serine 105 phosphorylation in GATA4 gonadal function. The results indicate that the GATA4 S105A mutation is associated with a significant change in the size of androgen-dependent reproductive tissues, and causes a significant decrease in testosterone levels in adult male mice which however remained fertile. Convincingly, our work revealed that this decrease in testosterone level correlates with a remarkable decrease in the expression of proteins and enzymes involved in the steroidogenesis process leading to the synthesis of testosterone. Finally, our results also suggest that abnormal steroidogenesis in *Gata4*^{S105A} mutants is not related to a lack of differentiation of Leydig cells but rather from specific alterations of the steroidogenesis program itself. In conclusion, the results presented in this thesis confirm the critical role of the proximal conserved Ebox element for expression of the 1a transcript in the gonads and demonstrate for the first time that phosphorylation of serine 105 of GATA4 is required *in vivo* for appropriate steroidogenesis in males.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

ÉTATS DES CONNAISSANCES

I- L'INFERTILITÉ ET SES CAUSES

Les problèmes associés à la reproduction chez l'homme affectent la qualité de vie des couples et constituent une préoccupation majeure de consultation médicale. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'infertilité correspond à la baisse ou l'absence de capacité à engendrer une descendance. Le diagnostic d'infécondité est posé après deux années de rapports sexuels sans utilisation de méthode contraceptive et n'ayant pas abouti à une grossesse. Elle concernerait 80 millions de personnes à travers le monde. Environ 500000 couples consultent chaque année afin d'être aidés pour concevoir un enfant, soit 1 couple sur 7. Selon Statistique Canada, l'infertilité a doublé au CANADA en 20 ans, passant de 8,5% en 1992 pour s'établir à 16% en 2012 (Bushnik *et al.*, 2012). D'où l'explosion des coûts liés aux recours aux traitements contre l'infertilité depuis la dernière décennie.

Les causes de l'infertilité humaine sont multiples. En plus des facteurs environnementaux (exposition à des substances toxiques ou à des températures élevées) et ceux liés au mode de vie (poids, alcool et tabagisme, usage de drogues), elles incluent les anomalies liées au développement du sexe. L'infertilité chez l'homme est multifactorielle. Elle peut provenir de l'âge avancé des partenaires, des problèmes ovulatoires résultant d'un déséquilibre hormonal, de problèmes anatomiques (blocage des trompes de Fallope), de l'endométriose, de la polykystose ovarienne qui affecte 5 % à 10 % des femmes en âge de procréer (Legro et Strauss Iii, 2002; Strauss, 2003; Wood *et al.*, 2003), d'anomalies des spermatozoïdes ainsi que de la dysfonction érectile.

La lutte contre les problèmes d'infertilité ainsi que l'amélioration de la santé reproductive passent donc par une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la fonction reproductive en situation normale et pathologique. Notre laboratoire explore à cette fin, le rôle des facteurs de transcription GATA qui interviennent dans la différenciation sexuelle, la régulation du développement et la fonction des gonades en agissant comme régulateurs de l'expression de plusieurs gènes exprimés dans les gonades. Et de façon intéressante, d'autres travaux ont justement mis en évidence une implication potentielle des facteurs GATA dans plusieurs pathologies incluant l'endométriose et le syndrome polykystique ovarien (Martin *et al.*, 2005; Sander *et al.*, 2011).

II- ORGANISATION HISTOLOGIQUE D'UNE GONADE

Malgré leurs différences anatomiques et histologiques, les gonades mâles et femelles demeurent similaires dans leur forme et fonctions. Les deux sont composés de cellules germinales dont la croissance et la maturation sont supportées par des facteurs sécrétés par des cellules somatiques. Dans les testicules, les cellules somatiques sont constituées principalement par les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig, alors que, dans les ovaires ce sont les cellules de la granulosa et de la thèque qui jouent ce même rôle.

2.1 Formation de la crête génitale

Au cours du développement fœtal chez les mammifères, le précurseur de la gonade embryonnaire est une structure sexuelle indifférenciée appelée crête génitale qui se différenciera en testicules ou ovaire selon que le sexe chromosomique soit XY ou XX, respectivement. La formation de la crête génitale débute par une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales cœlomiques qui vont former une couche dense à la surface médio ventrale du mésonéphros (Pelliniemi, 1975; Wartenberg *et al.*, 1991). Par

la suite, la membrane basale sous-jacente se fragmente permettant ainsi aux cellules épithéliales de migrer vers l'intérieur et former une structure épaissie à multiples couches (Karl et Capel, 1998; Kusaka *et al.*, 2010; Paranko, 1987) qui va générer la crête génitale (Pelliniemi, 1975; Wartenberg *et al.*, 1991; Yoshinaga *et al.*, 1988).

Chez la souris, la formation de la crête génitale débute autour du jour embryonnaire (E) 10,5 et se poursuit jusqu'au jour E11,5-E12,0 quand la différenciation sexuelle des gonades est avancée (Hacker *et al.*, 1995; Schmahl *et al.*, 2000). Le développement complet de la crête génitale nécessite l'expression d'une poignée de gènes incluant *Nr5a1/Sf1* (steroidogenic factor) (Luo *et al.*, 1994), *Lhx9* (Lim homeobox protein 9) (Birk *et al.*, 2000), *Wt1* (Wilm's tumor 1), *Emx2* (Empty spiracles homeobox 2) (Kusaka *et al.*, 2010; Miyamoto, N. *et al.*, 1997) et *Gata4* (Hu *et al.*, 2013a). Bien que ces différents facteurs, à l'exception de GATA4, ne soient pas associés à la formation précoce de la crête génitale, ils demeurent cependant nécessaires à sa croissance et son maintien. En effet, des embryons homozygotes nuls pour chacun de ces gènes peuvent subir l'étape initiale marquée par l'épaississement de la couche de cellules épithéliales mais régressent avant que la crête génitale ne soit totalement formée (Hu *et al.*, 2013b). Ce qui suggère qu'une étape ou un facteur additionnel est nécessaire pour initier la formation de la crête génitale. Ainsi tout récemment, la génération d'une souris *Gata4* conditionnelle à l'aide de la technologie Cre/loxP permettant la délétion du gène après le stade (E) 8,75 a permis de démontrer que GATA4 est bien le facteur déterminant pour initier la formation de la crête génitale (Hu *et al.*, 2013b).

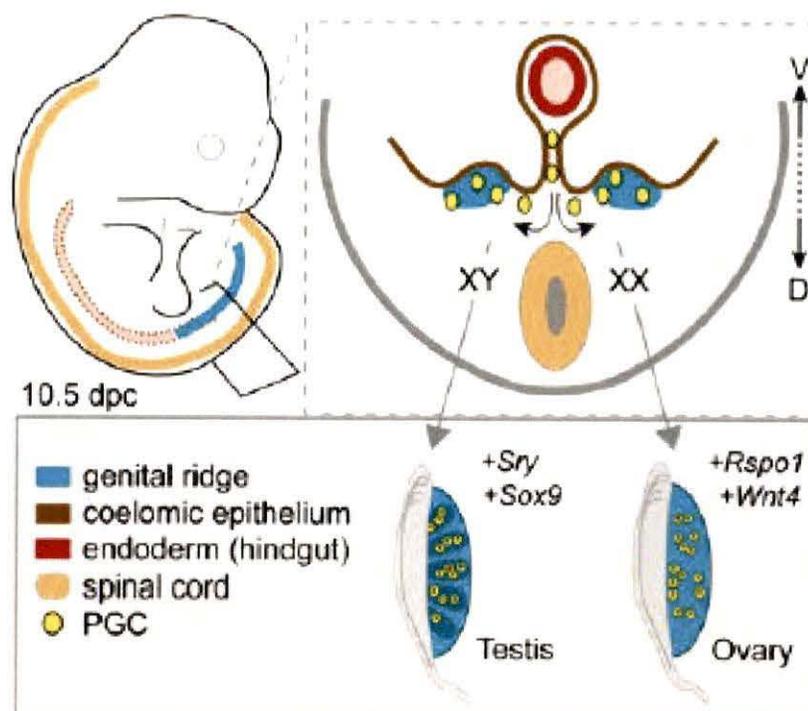


Figure 1.1 Formation de la crête génitale et détermination du sexe

Chez les mammifères, les crêtes génitales apparaissent généralement comme des excroissances longitudinales le long de la surface des mésonéphros à l'intérieur de la cavité coelomique. Chez la souris, elles émergent autour du 10^e jour embryonnaire suite au recrutement des cellules dérivées de l'épithélium coelomique. Les cellules germinales primordiales (PGC) colonisent les crêtes génitales après avoir quittées l'intestin postérieur via l'artère mésentérique dorsal. À ce stade, les crêtes génitales sont bi-potentiels puisqu'elles peuvent se différencier en testicules ou en ovaire dépendamment des marqueurs génétiques en présence. À partir du stade E10,5, l'expression du gène de la détermination du sexe *Sry* dans la crête génitale XY déclenche l'expression du gène *Sox9* menant à la différenciation des testicules. En l'absence de *Sry*, comme dans les crêtes génitales XX, la différenciation ovarienne est initiée par l'action des gènes tels que *Rspo1* et *Wnt4*. (D) dorsal; (V) ventral. Tiré de Svingen et Koopman (2013).

2.2 Histologie et formation du testicule

Le testicule adulte possède deux fonctions. Une fonction exocrine qui consiste à la production des spermatozoïdes et une fonction endocrine par la production des stéroïdes sexuels mâles notamment les androgènes dont la testostérone. Le testicule adulte est organisé en différents lobules dans lesquels on retrouve plusieurs longs filaments appelés tubes séminifères. Une coupe transversale de testicules montre qu'ils sont subdivisés en deux compartiments : le compartiment intratubulaire (tube séminifère) et le compartiment interstitiel. Les tubes séminifères sont le siège de la production des spermatozoïdes. Ils sont constitués des cellules germinales, des cellules de Sertoli et des cellules péricubulaires. Le compartiment interstitiel quant à lui est constitué de vaisseaux sanguins, de macrophages et des cellules de Leydig où s'effectue la biosynthèse des androgènes, principalement la testostérone. Les différentes fonctions du testicule sont régulées par le complexe hypothalamo-hypophysaire. Les facteurs et hormones produits par le testicule (testostérone, inhibine) vont en retour exercer un rétrocontrôle négatif ou positif sur la production de la GnRH et des gonadotropines (Miller, 2007).

Chez les mammifères, les cellules germinales appelées primordiales (PGCs) au stade foetal, ne sont pas présentes dans la crête génitale au départ, mais y migrent à partir de la base de l'allantoïde à l'extrémité postérieure de la ligne primitive. Les PGCs prolifèrent pendant toutes les étapes de leur migration vers la crête génitale (Ginsburg *et al.*, 1990; Tam et Snow, 1981). Parvenues dans la gonade, leur prolifération se poursuit activement jusqu'au stade E13,5 où elles demeurent pluripotentes et en expriment des marqueurs spécifiques tels que *Oct4*, *Sox2*, et *Nanog* (Chambers *et al.*, 2007; Kehler *et al.*, 2004; Pesce *et al.*, 1998).

2.2.1 Les spermatogonies

La morphogenèse des testicules s'amorce autour du jour E10,5 suivant l'expression du gène du déterminisme mâle *Sry* et la spécification des cellules de Sertoli. Un peu plus tard, la gonade XY subit une croissance ainsi qu'une réorganisation importante aboutissant à la formation des cordons testiculaires qui formeront les futurs

tubes séminifères (Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991; Sinclair, A. H. *et al.*, 1990). Chacun des cordons testiculaires est composé d'un groupe central de cellules germinales entourées de couches de cellules de Sertoli, de membrane basale et de cellules myoïdes périvitubulaires (Skinner *et al.*, 1985; Tung et Fritz, 1986). Il est évoqué que les cellules germinales primordiales seraient dérivées des cellules de l'épiblaste (ectoderme embryonnaire) (Lawson et Pedersen, 1992). Les cellules germinales présentes à l'intérieur des tubes séminifères sont morphologiquement différents des PGCs et sont appelées gonocytes (Huckins et Clermont, 1968). Ces gonocytes vont ensuite proliférer puis subir un arrêt mitotique en phase G0/G1 du cycle cellulaire jusqu'à la période post-natale (McLaren, 1984; Vergouwen *et al.*, 1991). Peu après la naissance, les gonocytes reprennent leur prolifération pour se différencier en spermatogonie de type A (Bellve *et al.*, 1977; Vergouwen *et al.*, 1991) marquant ainsi le début de la spermatogenèse proprement dite.

2.2.2 Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli constituent le centre organisationnel de la gonade mâle d'où elles commandent la différenciation de tous les autres types cellulaires pour parachever la différenciation et le développement des testicules. Les cellules de Sertoli se différencient à partir d'une population de cellules progénitrices SF1-positives dérivées de l'épithélium cœlomique qui tapissent les crêtes génitales (Karl et Capel, 1998). La différenciation de cellules pré-Sertoli en cellules de Sertoli se caractérise par leur polarisation, leur agrégation autour des cellules germinales ainsi que leur organisation en cordons testiculaires distincts (Brennan et Capel, 2004; Wilhelm *et al.*, 2007). La formation des cordons testiculaires se fait en trois étapes successives.

Dans un premier temps, les cellules de l'épithélium cœlomique migrent dans la crête génitale autour des jours E10,5-11,0 pour donner naissance aux cellules de Sertoli et à la population des cellules interstitielles chez la souris. Les cellules de l'épithélium cœlomique ne possèdent qu'une étroite fenêtre de deux heures entre les stades E11,2-11,4 pour se différencier en cellules de Sertoli. Passé ce délai, elles se différencient

exclusivement en cellules interstitielles (Karl et Capel, 1998; Schmahl *et al.*, 2000). Ensuite, la vascularisation primitive sous-jacente au mésonéphros se rompt, migre dans la gonade puis se réassemble pour élaborer la vascularisation spécifique des testicules. Enfin, les cordons s'entourent d'une couche de membrane basale afin de créer un environnement clos propice à la production de spermatozoïdes (Ungewitter et Yao, 2012). Les cellules de Sertoli fœtales ne semblent pas directement régulées par la stimulation hormonale provenant des gonadotropines et des androgènes, mais contrôlent tout de même la maturation, la migration des cellules germinales et jouent un rôle immuno-protecteur (Baker et O'Shaughnessy, 2001; O'Shaughnessy *et al.*, 2007). Au stade post-natal, les fonction des cellules de Sertoli sont régulées par les actions combinées de la FSH (hormone folliculo-stimulante) et des androgènes dont elles expriment les récepteurs, coïncidant avec l'augmentation générale de l'activité cellulaire (Denolet *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2004; O'Shaughnessy *et al.*, 2007). la FSH active l'expression du récepteur aux androgènes dans les cellules de Sertoli facilitant ainsi leurs actions au niveau de la spermatogenèse (Shan *et al.*, 1997; Verhoeven et Cailleau, 1988; Blok *et al.*, 1989). Les cellules de Sertoli sécrètent également plusieurs glycoprotéines qui concourent à la différenciation, au maintien des structures et à l'identité des testicules. C'est le cas notamment, de l'hormone anti-Müllérienne (AMH), premier facteur endocrine sécrété par le testicule fœtal, l'inhibine qui inhibe la sécrétion de la FSH et le c-kit ligand ou SCF (stem cell factor) impliqué dans la survie et la prolifération des spermatogonies (Allard *et al.*, 1996).

2.2.3 Les cellules de Leydig

Plusieurs types cellulaires tapissent l'interstitium ou espace entre les cordons cellulaires, c'est le cas des cellules endothéliales, des fibroblastes, des dérivés de cellules sanguines mais aussi et surtout des cellules de Leydig. Les cellules de Leydig sont des cellules polygonales dont le noyau arrondi contient de volumineux nucléoles. Chez les mammifères, on distingue deux populations de cellules de Leydig qui se succèdent selon le stade : les cellules de Leydig fœtales et adultes (Brennan et Capel, 2004). L'origine des

cellules de Leydig est assez controversée (Brennan *et al.*, 2003; Jeays-Ward *et al.*, 2003) mais deux origines sont préconisées selon des évidences récentes. Ainsi, les cellules de Leydig fœtales proviendraient soit de l'épithélium coelomique, soit de la frontière du mésonéphros, organe néphrétique rudimentaire qui contribue plus tard au développement de l'appareil reproducteur mâle (Morrish et Sinclair, 2002).

Dès le stade embryonnaire, les cellules de Leydig fœtale sécrètent des androgènes, incluant la testostérone nécessaire à la masculinisation (Huhtaniemi et Pelliniemi, 1992). Une variété d'enzymes reliées au cytochrome P450 et différentes déshydrogénases impliquées dans la conversion du cholestérol en testostérone y sont également synthétisées. Ce sont : le cytochrome P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage; coupure de la chaîne latérale), la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase, la 17 α -hydroxylase et la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase. Les cellules de Leydig fœtales jouent aussi un rôle dans la descente des testicules dans le scrotum via la synthèse du facteur INSL3 (insulin-like growth factor 3) (Adham et Agoulnik, 2004; Feng *et al.*, 2005; Nef et Parada, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999).

Après la naissance, les cellules de Leydig fœtales disparaissent. Chez la souris, une seconde population de cellules de Leydig commence à se différencier autour du 7^e jour post-natal (Lejeune *et al.*, 1998). Des études antérieures et plus récentes soutiennent que les cellules de Leydig adultes se différencient à partir de cellules mésenchymales pérیتubulaires (Ariyaratne *et al.*, 2000; Haider *et al.*, 1995; Haider et Servos, 1998) mais n'excluent pas une contribution mineure de cellules périvasculaires dans leur origine (Haider *et al.*, 1995; Haider et Servos, 1998).

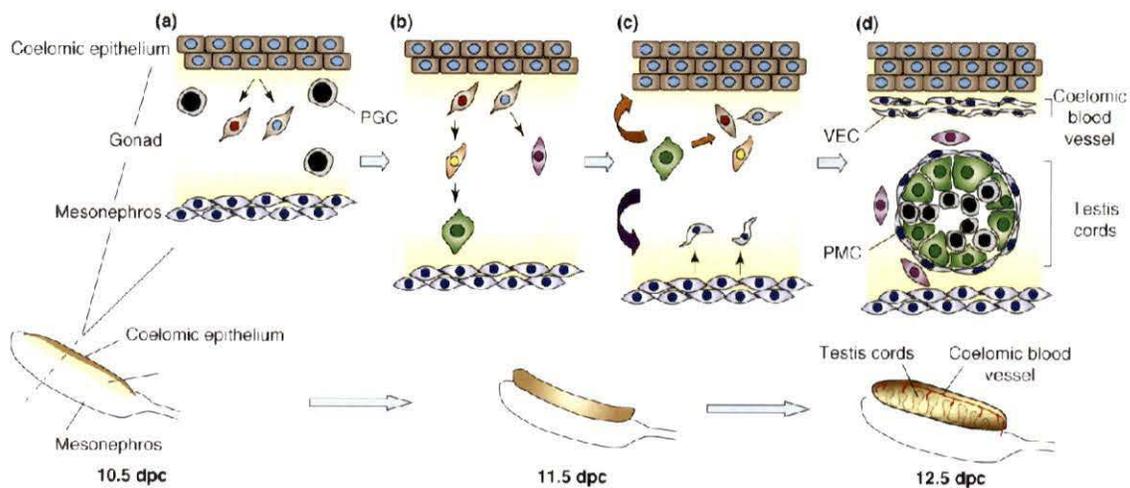


Figure 1.2 Organisation cellulaire au cours de la différenciation des testicules chez la souris

Le testicule est composé de cellules germinales et somatiques. Les cellules somatiques sont constituées de cellules de Sertoli, de Leydig ainsi que des cellules du tissu conjonctif notamment les cellules myoïdes péritubulaires (PMC) et les cellules vasculaires endothéliales (VEC). (a) Le testicule provient de la crête génitale qui est d'abord reconnue comme un épaissement de l'épithélium coelomique adjacent au mésonéphros (b) La crête génitale est ensuite colonisée par les cellules germinales primordiales (PGC, noir) dont la migration s'arrête vers le stade E11,5. (c) Les cellules dérivées de l'épithélium coelomique qui sont positives pour le facteur SF1 (bleu clair), prolifèrent et migrent dans la crête génitale où une proportion de cellules filles exprimant SRY formeront les précurseurs de cellules de Sertoli (rouge) tandis que le reste se différencie en cellules interstitielles incluant les cellules de Leydig (rose). L'expression de *SRY* est suivie par une augmentation du facteur Sox9 dans les précurseurs des cellules de Sertoli (jaune). Les cellules SOX9-positives libèrent ensuite des molécules de signalisation telle que FGF9 qui renforce l'expression de SOX9 et induit la prolifération de cellules avoisinantes (flèches orange). Il s'établit une boucle de régulation permettant d'atteindre un nombre suffisant de cellules de Sertoli pour la formation du testicule. Les cellules SOX9 positives induisent également la migration des cellules du mésonéphros (flèche mauve) incluant principalement les cellules vasculaires endothéliales qui se réagrégent pour former la barrière hémato-testiculaire. (d) Les cordons testiculaires se forment autour du jour E12,5. Ils contiennent les cellules germinales entourées de cellules de Sertoli. dpc: day post-coïtum. Tiré de Sekido et Lovell-Badge (2009).

Les cellules de Leydig au stade post-natal sont très sensibles aux variations des niveaux de LH contrairement aux cellules de Leydig fœtales (O'Shaughnessy *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001) et leur maturation est également dépendante de l'action des androgènes (O'Shaughnessy *et al.*, 2002). La libération de la gonadotropin-releasing hormone (GnRH) par l'hypothalamus stimule la production par les cellules gonadotrophes, de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH) qui agissent sur les testicules. La LH se lie à ses récepteurs à la surface des cellules de Leydig pour induire la production de testostérone qui diffuse dans les tubes séminifères (Walker et Cheng, 2005). La FSH et la testostérone agissent indépendamment mais de façon interactive directement pour réguler l'activité des cellules de Sertoli qui possèdent leurs récepteurs appropriés pour mener à la sécrétion de facteurs critiques pour la survie et la progression des cellules germinales (Abel *et al.*, 2008; Lyon *et al.*, 1975; Zhou, X. *et al.*, 1996).

2.3 Histologie et formation de l'ovaire

L'ovaire adulte possède deux fonctions. Une fonction exocrine qui consiste à la libération d'ovocytes et une fonction endocrine conduisant à la production d'oestrogènes et de progestérone. Une coupe transversale montre que l'ovaire adulte est composé de deux régions: une médulla centrale par où passe l'innervation ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et d'un cortex périphérique, siège de l'activité folliculaire. Les follicules constituent l'unité fonctionnelle des ovaires. Un follicule ovarien est un agrégat cellulaire sphérique contenant en son sein un ovule qui forme le gamète femelle. L'ovule ceinturé par une couche de glycoprotéine, formant la zone pellucide, est entouré d'une couche de cellules supportrices, les cellules de la granulosa. Les cellules de la granulosa sont elles-mêmes entourées d'une mince couche de matrice extracellulaire qui est finalement enveloppée par plusieurs couches de cellules supplémentaires, formant la thèque interne très vascularisée. Les follicules contiennent des gamètes femelles à différents stades de développement. De plus, on y retrouve aussi des follicules post-ovulatoires de différentes sortes que l'on appelle des corps jaunes (responsables de la

production d'oestrogène et de progestérone), des follicules dégénératifs (corpus albicans) et des follicules atrétiques. Les cellules de la thèque sont séparées des cellules de la granulosa par une membrane basale.

Dans l'ovaire foetal, les cellules pré-granulosa sont les premiers précurseurs de cellules somatiques, ils se différencient autour du jour E12,5 (Ottolenghi *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2004). La première étape de la folliculogenèse se produit lorsque les cellules de la granulosa décomposent les nids de cellules germinales et les entourent pour former des follicules primordiaux (Hirshfield, 1991). Les cellules de la granulosa jouent le même rôle que les cellules de Sertoli dans les testicules. Elles entourent les cellules germinales et sécrètent des facteurs nécessaires pour la croissance et la maturation des ovocytes. La spécification des cellules de la thèque se déroule un peu plus tard lorsque les follicules activés recrutent les cellules précurseurs de la thèque à partir de la couche de stroma entourant les cellules de la granulosa et les ovocytes. Les cellules de la thèque sont les homologues femelles des cellules de Leydig.

2.3.1 Les ovogonies

Contrairement aux testicules où la formation des cordons testiculaires débute autour du jour E12,5, la différenciation des follicules ovariens ne débute qu'après la naissance. En effet, à cette période, les précurseurs des follicules matures, les follicules primordiaux, sont formés quand les cellules pré-granulosa envahissent des nids de cellules germinales en brisant leur aggrégation. En conséquence, des ovocytes individuels s'entourent de cellules pré-granulosa complétant ainsi la formation du follicule primordial (Edson *et al.*, 2009; Merchant, 1975; Pepling et Spradling, 1998). Le développement du follicule ovarien demeure tributaire de la présence des cellules germinales au contraire des testicules où les cordons débute leur formation indépendamment de la présence de ces dernières (Behringer *et al.*, 1990). De façon prédominante, les follicules primordiaux se localisent dans le cortex ovarien alors que ceux qui restent au niveau de la médulla meurent par apoptose (Yao, H. H. *et al.*, 2004).

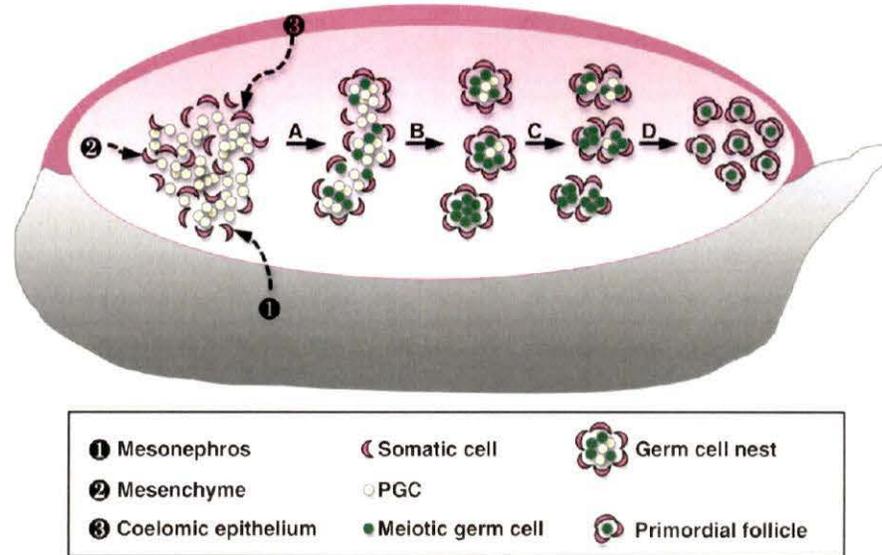


Figure 1.3 Morphogenèse de l'ovaire fœtal chez la souris

Suite à leur migration et à la colonisation de la crête génitale, les cellules germinales primordiales fusionnent avec les cellules somatiques provenant de trois origines possibles : le mésonephros sous-jacent (1), le mésenchyme environnant et/ou l'épithélium coelomique adjacent. (A) Les cellules somatiques et les cellules germinales primordiales forment les cordons ovigères. Les cellules germinales femelles commencent à entrer en méiose autour du jour E13.5. (B) Les nids de cellules germinales entourés par des cellules somatiques commencent à se former. (C) Au moment de la naissance, les cellules somatiques commencent à défaire les nids de cellules germinales en entourant les ovocytes individuels. (D) La désagrégation des amas de cellules germinales conduit à la formation de follicules primordiaux. Tiré de Liu *et al.* (2010).

Au cours du développement de l'ovaire fœtal, les cellules germinales précoces appelées ovogonies se divisent par mitose dès qu'elles colonisent la crête génitale jusqu'au jour E13,5 où elles rentrent en méiose (Monk et McLaren, 1981). L'induction de la méiose ovarienne résulte de l'activation du marqueur *Stra8* stimulé par l'acide rétinoïque (Anderson *et al.*, 2008; Baltus *et al.*, 2006; MacLean *et al.*, 2007). À partir de ce moment, les ovogonies deviennent des ovocytes. L'initiation de la méiose dans l'ovaire se fait de la portion antérieure vers le pôle postérieur (Bullejos et Koopman, 2004; Menke *et al.*, 2003). Les ovocytes poursuivront les différentes étapes de la prophase de cette première

méiose pour s'arrêter au stade diplotène autour du jour E17,5 jusqu'au 5^e jour post-natal (Borum, 1961; McLaren, 2000).

2.3.2 Les cellules de la granulosa

L'ovaire est divisé en deux compartiments : une médulla centrale par où pénètre l'innervation ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et d'un cortex périphérique siège de l'activité folliculaire. Les observations morphologiques et histologiques permettent d'avancer trois origines possibles pour les précurseurs des cellules de la granulosa. Ils proviennent soit de la surface de l'épithélium ovarien (Motta et Makabe, 1982; Sawyer *et al.*, 2002), soit des cellules mésonephriques du rete ovarii adjacent (Byskov, 1975, 1978; Martineau *et al.*, 1997) ou des cellules mésenchymales existant dans la crête génitale (Albrecht et Eicher, 2001). L'ovaire a une fonction endocrine puisqu'il sécrète des hormones stéroïdiennes notamment les œstrogènes (dont l'œstradiol), la progestérone et des androgènes afin de garantir la génération d'ovocytes matures.

Le follicule est l'unité fonctionnelle de l'ovaire. Il est constitué d'ovocyte mature entouré par les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque interne, siège de la stéroïdogénèse. Les cellules de la granulosa sont dépourvues de P450C17, elles ne peuvent donc synthétiser les androgènes précurseurs des œstrogènes mais importent les androgènes à partir de la thèque pour la synthèse des œstrogènes.

2.3.3 Les cellules de la thèque interne

On a longtemps pensé que les cellules de la thèque proviennent des cellules précurseurs des fibroblastes au sein du stroma ovarien (Dyer et Erickson, 1985; Honda *et al.*, 2007; Orisaka *et al.*, 2006). Mais vu que les cellules de la thèque sont associées avec les follicules en croissance, il est ainsi supposé que le follicule lui-même produise des facteurs qui signalent au stroma de recruter des cellules qui forment la thèque interne.

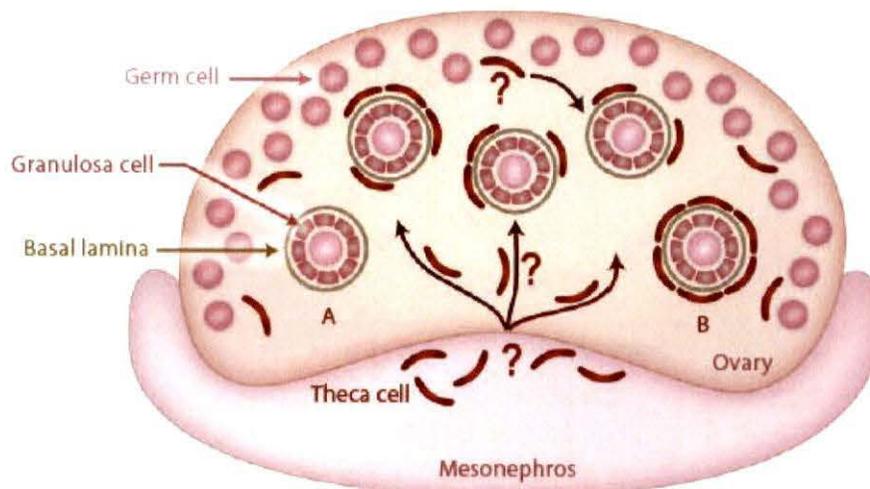


Figure 1.4 Physiologie de l'ovaire au stade post-natal

Les cellules de la thèque sont recrutées pour former les follicules primordiaux au cours de la première semaine après la naissance. L'origine des cellules de la thèque n'est pas totalement définie. Deux sources sont évoquées, notamment le mésonéphros et le stroma ovarien marqués par des points d'interrogation. Suivant l'activation des follicules primordiaux, l'ovocyte et/ou les cellules somatiques du follicule produisent des facteurs qui favorisent la différenciation et la migration des cellules progénitrices de la thèque. Plusieurs étapes du développement folliculaire sont illustrées allant du follicule primordial (A) au follicule primaire (B). Tiré de Ungewitter et Yao (2013).

L'hypothèse sur l'origine stromale des cellules de la thèque fut confirmée par des expériences réalisées chez le bovin qui suggèrent que les précurseurs des cellules de la thèque proviennent du stroma ovarien (Orisaka *et al.*, 2006). Comme des différences significatives spécifiques à chaque espèce existent en ce qui concerne le développement des ovaires, il est donc possible que les cellules de la thèque chez l'homme et même la souris ont une origine non stromale. Comme il est aussi tout à fait possible que ces cellules proviennent de plus d'une source à l'instar de leurs homologues dans les testicules (Ungewitter et Yao, 2012). Dans tous les cas, très peu d'études ont été menées à ce propos pour permettre une conclusion claire sur l'origine des cellules de la thèque.

Les cellules de la thèque présentent une structure fortement différenciée caractéristique de cellules sécrétrice de stéroïde incluant d'abondantes mitochondries, du

réticulum endoplasmique agranulaire et de nombreuses vésicules lipidiques (Magoffin, 2005). Les mitochondries des cellules de la thèque contiennent la première enzyme essentielle de la stéroïdogénèse, la cytochrome P450-scc (cholestérol side chain clivage codée par le gène *CYP11A1*). Le réticulum endoplasmique contient les autres enzymes nécessaires à la production des androgènes. Les vésicules lipidiques quant à eux, entreposent les précurseurs pour la synthèse des hormones stéroïdiennes notamment les esters du cholestérol qui sont transportés dans la mitochondrie par la protéine StAR (Manna *et al.*, 2009). Les cellules de la thèque possèdent un récepteur de la LH qui stimule la conversion du cholestérol en prégnénolone. Les cellules de la thèque remplissent deux fonctions critiques pour le follicule: elles sécrètent à la fois des androgènes, substrats nécessaires à la synthèse d'œstradiol par les cellules de la granulosa (Rajah *et al.*, 1992; Young et McNeilly, 2010) et procurent un support structural par l'établissement d'un système vasculaire pour la nutrition du follicule en croissance.

III- CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DE LA DÉTERMINATION DU SEXE

3.1 Le développement gonadique

Le développement gonadique peut être défini comme le processus par lequel les gonades bi-potentielles (ou crête génitale) de l'embryon acquièrent leur destin final pour se différencier en testicules ou en ovaires avec leurs structures afférentes. Au cours de ce processus, deux événements majeurs se succèdent : la détermination du sexe et la différenciation sexuelle. Au stade E11,5, la gonade bi-potentielle ou crête génitale contient à la fois les cellules progénitrices des cellules somatiques et germinales. La détermination du sexe proprement dite est contrôlée par un groupe de régulateurs transcriptionnels et débute quand le destin d'une crête génitale indifférenciée est établi et résulte en la différenciation des progéniteurs des cellules somatiques vers la voie mâle (développement des testicules) ou femelle (développement des ovaires). La différenciation sexuelle est la seconde étape suivant la détermination du sexe. Elle est initiée par l'expression de gènes spécifiques et est généralement régulée par l'action de différentes hormones couplées à leurs récepteurs et résulte en l'apparition du sexe phénotypique. La détermination du sexe peut aussi être comparée à une histoire de forces qui s'opposent entre elles et d'alliances cruciales qui se tissent afin de permettre à l'équipe gagnante de s'installer. Cependant, la force et la durée de cet équilibre demeure précaire vu la variabilité dans l'expression spatio-temporelle des forces en présence (Sekido et Lovell-Badge, 2009).

3.2 Détermination et différenciation de la voie mâle

Chez les mammifères, la détermination et la différenciation du sexe mâle sont reliées à l'expression du gène *SRY/Sry* (sex-determining region of chromosome Y) localisé sur le chromosome Y (Berta *et al.*, 1990). L'expression transitoire de *Sry* dans les cellules pré-Sertoli, initie la différenciation et le développement des testicules à partir de l'ébauche indifférencié des gonades (Swain et Lovell-Badge, 1999). Chez la souris, l'expression de *Sry* se déroule dans une fenêtre critique; elle est détectée autour du jour

E10,5 juste après l'apparition de la crête génitale, atteint son pic autour du stade E11,5 et chute progressivement après le stade E12,5 (Biason-Lauber, 2010). Sry en association avec SF1 active ensuite *Sox9* en se liant directement à des sites spécifiques d'ADN d'un enhancer testicule spécifique localisé en amont du promoteur de *Sox9* afin de promouvoir la différenciation des cellules de Sertoli (Sekido et Lovell-Badge, 2008). Lorsque les niveaux de *Sox9* atteignent un seuil critique alors que les niveaux d'expression de *Sry* sont réduits, le maintien de l'expression de *Sox9* est assuré par des boucles de rétro-contrôle initiés soit par autorégulation directe de *Sox9* lui même soit via la voie de signalisation FGF9. *Sox9* déclenche par la suite une cascade d'évènements notamment la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique ainsi que la migration des cellules du mésonéphros pour garantir la différenciation des testicules (Sekido et Lovell-Badge, 2009). *Sox9* contribue à la régression des canaux de Müller (qui se différencient ultimement pour générer les trompes de Fallope, l'utérus et la partie supérieure du vagin) en activant l'expression des prostaglandines (Wilhelm *et al.*, 2007) et surtout la sécrétion de l'hormone anti-Müllérienne (AMH aussi appelée MIS) par les cellules de Sertoli des testicules nouvellement formés (Josso *et al.*, 2006; Sekido et Lovell-Badge, 2009). Pendant ce temps, la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig fœtaux contribue avec AMH à la vascularisation des testicules formés (McClelland *et al.*, 2012) et à l'augmentation de la taille du canal mésonéphrique (ou canal de Wolff). Ce dernier se différenciera pour générer l'épididyme, le canal déférant et la vésicule séminale (Biason-Lauber, 2010). SRY pourrait également inhiber directement ou indirectement via SOX9 la β -caténine en favorisant sa dégradation afin de garantir la dormance complète de la voie femelle (voir sections 3.4 et 3.5) (Bernard *et al.*, 2008).

3.3 Gènes clés pour la différenciation des cellules de Sertoli et Leydig

3.3.1 SRY

SRY (sex determining region Y) est considéré comme le déterminant sexuel mâle qui agit comme un interrupteur moléculaire pour faire basculer la crête génitale bipotentielle vers la différenciation testiculaire puisqu'en effet, l'expression transgénique

de *Sry* chez une souris XX entraîne le développement de testicules (Koopman *et al.*, 1991). Il est localisé dans la région de détermination sexuelle du chromosome Y et fait partie de la famille des facteurs de transcription SOX (SRY-related HMG box) qui se distinguent par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN conservé appelé boîte HMG (high mobility group). Chez l'homme, plusieurs cas de réversion sexuelle XY répertoriés ont été associés aux mutations du gène *SRY* (Harley *et al.*, 2003) tandis que des cas de réversion sexuelle XX résultant de la translocation d'une portion de la région Y contenant *SRY* sur le chromosome X ont été documentés chez l'homme et la souris (Gubbay *et al.*, 1990; Sharp *et al.*, 2005). Le gène *SRY* humain comme celui de la plupart des mammifères est dépourvu d'intron et code pour une protéine de 204 acides aminés (Südbeck et Scherer, 1997). Chez la souris, le gène *Sry* est flanqué d'une série de larges séquences inversées répétées (absentes du *SRY* humain) (Hacker *et al.*, 1995) qui sont à l'origine de la forme circulaire des transcrits détectés dans le testicule adulte (Capel *et al.*, 1993). *Sry* contient un long cadre de lecture ouvert qui peut produire une protéine de 395 acides aminés incluant le domaine HMG de liaison à l'ADN (Gubbay *et al.*, 1990).

Le profil d'expression spatio-temporel de *Sry* est très restreint dans le temps (E10,5–12,5) (Hiramatsu *et al.*, 2009; Kim, Y. et Capel, 2006). *Sry* est exprimé par les précurseurs de cellules de Sertoli autour du jour E10,5 suivant l'apparition de la crête génitale, son expression atteint son pic entre E11-11,5 et s'éteint après E12,5 (Jeske *et al.*, 1995; Koopman *et al.*, 1990). L'expression continue de *Sry* n'est donc pas nécessaire pour la suite des processus de détermination et différenciation sexuelle.

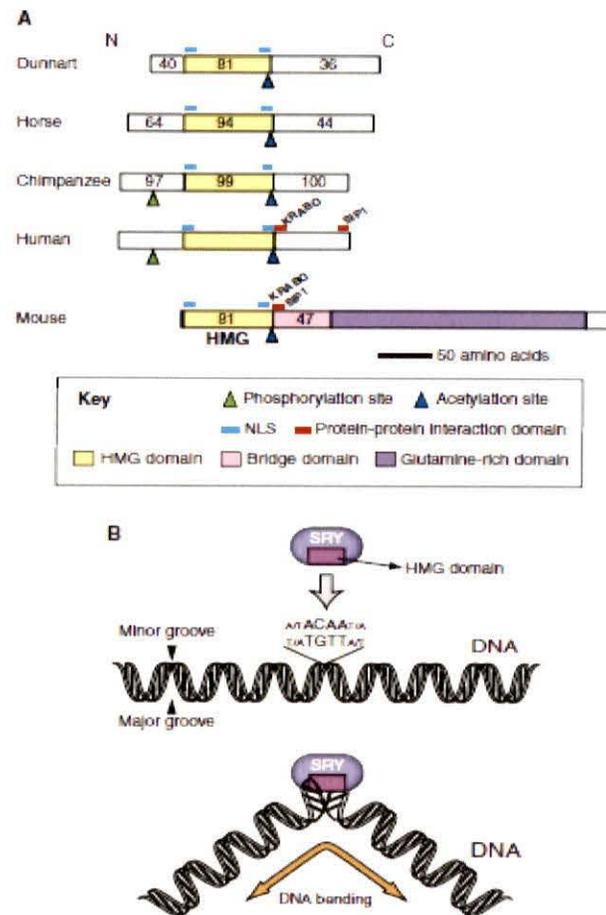


Figure 1.5 Structure et fonction de la protéine SRY (A) Comparaison de la structure de la protéine SRY (sex-determining region on the chromosome Y) parmi cinq espèces de mammifère: dunnart (souris marsupiale), cheval, chimpanzé, homme et souris. Le domaine HMG (high-mobility group) est indiqué en jaune, les nombres indiquent le pourcentage d'homologie dans sa séquence en acides aminés hautement conservée chez différentes espèces incluant l'homme. On y retrouve également les sites de modification post-traductionnelles (signal de localisation nucléaire (NLS), sites de phosphorylation et d'acétylation ainsi que des domaines d'interactions protéine-protéine). La protéine SRY chez la souris détient un unique domaine riche en glutamine (en pourpre). De plus son domaine HMG et le domaine riche en glutamine sont séparés par un domaine de fonction inconnue («bridge», en rose). Sont aussi indiqués les sites de liaison des répresseurs KRABO (Kruppel associated box domain) et de la «SRY-interacting protein 1» (SIp1). (B) La protéine SRY se lie à l'ADN. La structure en double hélice de l'ADN contient deux rainures, majeure et mineure. Le domaine HMG de SRY reconnaît et se lie au motif (A/T)ACAA(T/A) à l'intérieur de la rainure mineure, menant à une flexion de la double hélice d'ADN. Tiré de Kashimada et Koopman (2010).

3.3.2 SF1

La protéine SF1 (steroidogenic factor 1) (aussi connu comme NR5A1 pour Nuclear Receptor Subfamily 5, groupe A, membre 1) est un récepteur nucléaire orphelin qui a d'abord été identifié comme un régulateur de l'expression des enzymes P450 hydroxylases responsables de la synthèse des hormones et autres composés stéroïdiens (Ikeda *et al.*, 1993; Lala *et al.*, 1992). Des études antérieures ont permis d'explorer la fonction de SF1 au cours de la détermination et la différenciation sexuelle. Chez l'homme, le gène est composé de sept exons (Parker, 1999). Des mutations hétérozygotes pour *SF1* ont été retrouvées chez des patients 46, XY souffrant de désordres liés au développement du sexe. Ces patients présentent un phénotype de dysgénésie testiculaire complète, incluant divers degrés de réversion sexuelle souvent associée à de sévères insuffisances en divers dérivés stéroïdiens, notamment les androgènes (Achermann *et al.*, 1999; Correa *et al.*, 2004; Köhler *et al.*, 2008; Lin et Achermann, 2008; Philibert *et al.*, 2007).

Chez la souris, *Sfl* est exprimé par la crête génitale bi-potentielle autour des jours E9-9,5 (Ikeda *et al.*, 1994) correspondant environ à la 4^e semaine de gestation chez l'homme. Son expression devient dimorphique au moment de la détermination sexuelle, soit aux environs du jour E12.5. Elle persiste dans les cellules de Sertoli et de Leydig des testicules mais est réprimée dans l'ovaire où son expression est maintenue à de faible niveaux jusqu'à l'âge adulte où une forte expression est détectée dans les cellules de la thèque (Ikeda *et al.*, 1994). *Sfl* est également exprimé de façon précoce au niveau de la glande surrénale (Martinerie *et al.*, 2009) mais aussi dans l'hypophyse et au niveau de l'hypothalamus (Ikeda *et al.*, 1996; Ikeda *et al.*, 2001). Les souris invalidées pour le gène *Sfl* sont dépourvues de glandes surrénales et de gonades. Leur tractus reproducteur est constitué d'organes génitaux féminisés en plus d'anomalies de l'hypophyse et de l'hypothalamus (Luo *et al.*, 1994; Parker et Schimmer, 1997). Les fœtus *Sfl*^{-/-} parviennent à termes, survivent quelques jours puis meurent d'insuffisance cortico-surrénalienne (incapacité à synthétiser les corticostéroïdes) (Luo *et al.*, 1995). Il a été en effet démontré que SF1 peut activer directement l'expression de deux importants gènes de la voie mâle.

Il se lie au promoteur de l'*Amh* en association avec la forme -KTS de WT1 (Nachtigal *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1994) pour induire la régression des canaux de Müller et à *Sox9* via son enhancer TESCO en synergie avec Sry afin de soutenir l'expression de *Sox9* (Sekido et Lovell-Badge, 2008). Enfin, en plus de *DAX1* (Hoyle *et al.*, 2002; Kawabe *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1998), d'autres acteurs majeurs de la stéroïdogénèse constituent le panel de gènes régulés par SF1 notamment *LHB* (sous-unité B de l'hormone lutéinisante) (Halvorson *et al.*, 1998), *Star* (steroidogenic acute regulatory protein) (Sugawara *et al.*, 1996), de même que les gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse *CYP11A1* (P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) (Clemens *et al.*, 1994) et *CYP19A1* (P450 aromatase) (Fitzpatrick et Richards, 1993; Lynch *et al.*, 1993).

3.3.3 *WT1*

Le gène *WT1* (Wilm's tumor 1) est constitué de 10 exons et encode une protéine en doigts de zinc (Call *et al.*, 1990; Campbell *et al.*, 1994; Dallosso *et al.*, 2004). *WT1* est exprimé dans plusieurs tissus du rein en développement et de façon intéressante il est essentiel au développement de la crête génitale et la gonade fœtale (Kreidberg *et al.*, 1993). *WT1* contrôle la prolifération, la différenciation cellulaire et pourrait agir comme un répresseur ou un activateur dépendamment du contexte (Laity *et al.*, 2000). Ainsi, *WT1* agit comme un gène suppresseur de tumeur essentiel au développement embryonnaire. En effet, des mutations de *WT1* sont associées à certaines pathologies telles que les tumeurs de Wilms, une forme de cancer du rein pédiatrique (Call *et al.*, 1990; Gessler *et al.*, 1990). *WT1* est transcrit selon un mode d'épissage alternatif générant quatre isoformes majeures de la protéine parmi vingt-quatre possibilités (Englert, 1998). Justement, l'épissage alternatif au niveau du 9^e exon génère les isoformes (+KTS) et (-KTS) caractérisés par l'insertion ou l'absence de trois acides aminés : lysine (K), threonine (T) et sérine (S) (Haber *et al.*, 1991). Les isoformes +KTS sont généralement localisés avec des facteurs d'épissage et peuvent jouer un rôle dans la maturation des ARNs, alors que les isoformes -KTS agissent généralement comme des facteurs de transcription qui activent ou répriment la transcription. Il a été rapporté que l'isoforme -

KTS module l'activité promotrice de plusieurs gènes impliqués dans le développement gonadique et la différenciation sexuelle mâle, notamment *Sry* (Hossain et Saunders, 2001), *Sox9* (Gao *et al.*, 2006), *Amh* en association avec *Sfl* (Hossain et Saunders, 2003), *Sfl* (Wilhelm et Englert, 2002) mais aussi *Wnt4* (Sim *et al.*, 2002) et *Dax1* (Kim, J. *et al.*, 1999). Les gonades de souris exprimant uniquement les isoformes +KTS ne parviennent pas à fonctionner à cause de la présence de tissus fibreux. Elles subissent l'apoptose tandis que celles exprimant uniquement l'isoforme -KTS se développent mais tous les mâles XY présentent une réversion sexuelle complète résultant d'une réduction drastique des niveaux d'expression de *Sry* (Hammes *et al.*, 2001). Ces observations suggèrent que les isoformes -KTS seraient nécessaires pour la formation de la crête génitale et que les isoforme +KTS seraient nécessaires à l'expression de *Sry* (Hammes *et al.*, 2001) et essentiels pour la différenciation des testicules et non pour le développement des ovaires ni pour la formation de la crête génitale. Chez l'humain, le ratio entre les deux isoformes est critique pour la différenciation gonadique normale, +KTS étant l'isoforme préférentielle dans une proportion de 2 pour 1 (Klamt *et al.*, 1998). D'ailleurs la perte de ces isoformes qui sont les plus abondants conduit au syndrome de Frasier caractérisé par un pseudohermaphrodisme mâle marqué par la présence de testicules auxquels s'associent une ou plusieurs caractéristiques femelles, une dysgénésie complète des gonades ainsi qu'une néphropathie (Barboux *et al.*, 1997; Klamt *et al.*, 1998).

Chez l'homme, *WT1* est exprimé dans le mésonéphros et la crête génitale à partir de la 7^e semaine de gestation (Mundlos *et al.*, 1993; Pritchard-Jones *et al.*, 1990). Chez la souris, *Wt1* est exprimé avant le début de la différenciation sexuelle à partir du jour E9 dans le mésoderme intermédiaire (Kreidberg *et al.*, 1993). L'expression de *WT1* est maintenue dans les cellules de Sertoli des testicules adultes ainsi que dans les cellules folliculaires de l'ovaire (Pelletier *et al.*, 1991). Enfin, *WT1* est impliqué dans plusieurs étapes du développement des testicules allant de la formation et la survie de la crête génitale, la différenciation des cellules de Sertoli, la survie et la prolifération des cellules germinales embryonnaires ainsi qu'au développement et à la fonction des cellules de Leydig fœtale (Natoli *et al.*, 2004).

3.3.4 FGF9

FGF9 est un facteur régulateur de la famille FGF (fibroblast growth factor) impliqué dans de multiples processus biologiques tels que la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaire depuis l'embryogenèse jusqu'à la vie adulte (Colvin *et al.*, 2001). Chez l'homme, le gène encode une protéine de 208 acides aminés (Pellegrini *et al.*, 2000). FGF9 exerce ses fonctions biologiques en se liant à son récepteur de surface FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) intégré à la membrane plasmique des progéniteurs des cellules de Sertoli (Kim, Y. *et al.*, 2007; Pellegrini *et al.*, 2000). *Fgf9* est détecté dans la crête génitale durant une courte période précédant la détermination du sexe chez la souris puis devient mâle spécifique montrant une expression au niveau de l'épithélium coelomique et dans les cellules de Sertoli (Colvin *et al.*, 2001; Kim, Y. *et al.*, 2006a). L'inactivation du gène *Fgf9* entraîne chez les souris, dépendamment du fond génétique, un phénotype de réversion sexuelle mâle-femelle qui suggère un important rôle de ce gène dans la différenciation des testicules (Colvin *et al.*, 2001; Schmahl *et al.*, 2004). En fait, l'absence de *Fgf9* est associée à un arrêt du maintien de l'expression de *Sox9* menant à un échec de différenciation des cellules de Sertoli. Le développement des testicules est donc interrompu laissant apparaître des structures ovariennes. D'autres études réalisées sur des souris ont aussi démontré que FGF9 et le facteur femelle WNT4 agissent comme des signaux qui s'opposent au cours de la détermination du sexe. De ce fait, SRY et SF1 initient une boucle de rétro-action positive régulant à la hausse l'expression de SOX9 qui à son tour régule à la hausse l'expression de FGF9, conduisant à la répression des signaux WNT4 et mène à la différenciation des testicules (Kim, Y. *et al.*, 2006b). Enfin, dans les testicules fœtaux, FGF9 est nécessaire pour la survie des cellules germinales et prévient également leur entrée en méiose (Bowles *et al.*, 2010; DiNapoli *et al.*, 2006).

3.3.5 DMRT1

DMRT1 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1) représente l'un des quelques gènes impliqués dans la détermination du sexe à être conservé à travers

différents espèces et embranchements, y compris chez les vertébrés et les invertébrés (Zarkower, 2001). Toutes les protéines DMRT sont des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'un domaine de liaison similaire à un motif en doigt de zinc appelé domaine DM qui a été identifié pour la première fois dans les protéines MAB3 de *Caenorhabditis elegans* et DSX (doublesex) de *Drosophila melanogaster* (Raymond *et al.*, 1998). Chez l'humain, l'expression du gène *DMRT1* est détectée dans la crête génitale à partir de la sixième semaine de gestation. Son expression est ensuite localisée dans les cellules pré-Sertoli des cordons testiculaires en formation au cours de la septième semaine. Aucune expression de *DMRT1* n'a par contre été démontrée à aucune étape du développement embryonnaire des gonades chez la femme (Moniot *et al.*, 2000).

Chez la souris cependant, *DMRT1* est exprimé dans l'ébauche gonadique des deux sexes autour du jour E10,5 et au jour E12,5 son expression décroît dans l'ovaire jusqu'à disparaître alors qu'elle augmente dans les testicules, maintenant des hauts niveaux d'expression dans les cellules de Sertoli et germinales pré-méiotiques jusqu'au stade adulte (De Grandi *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 1999; Raymond *et al.*, 2000). Les souris *Dmrt1* nulles ne présentent pas d'anomalies du développement des gonades au stade embryonnaire suggérant que ce gène n'est pas déterminant pour les étapes précoces de la gonadogenèse. Ces souris présentent cependant une sévère dysgénésie des testicules (Kim, S. *et al.*, 2007) associée à la présence de cellules germinales femelles à partir du deuxième jour post-natal (Matson *et al.*, 2011). De façon similaire, les patients *DMRT1* hétérozygotes chez l'homme souffrent du même phénotype de dysgénésie testiculaire souvent associé au désordre lié au développement du sexe (DSD) (Crocker *et al.*, 1988; Raymond *et al.*, 1998). Ces données indiquent un rôle critique de *DMRT1* dans le développement testiculaire après la naissance puisqu'il est nécessaire au maintien des cellules germinales et de Sertoli (Raymond *et al.*, 2000).

3.3.6 DAX1

À l'instar de SRY, DAX1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1) aussi appelée NR0B1 est le seul

des autres facteurs impliqués dans le développement gonadique à être codé sur un chromosome sexuel, en particulier le chromosome X. *DAX1* a été initialement identifié comme étant à l'origine de l'hypoplasie surrénalienne congénitale associée à l'hypogonadisme hypogonadotrophique, un désordre récessif affectant uniquement les individus de sexe masculin (Muscatelli *et al.*, 1994; Zanaria *et al.*, 1994). Par ailleurs, la duplication du gène *DAX1* se produit chez l'humain et est responsable d'un désordre sexuel caractérisé par un phénomène de réversion sexuelle plus ou moins important chez les sujets mâles (Bardoni *et al.*, 1994).

La fonction de *DAX1* demeure mal comprise. Chez la souris, l'expression de *Dax1* est détectée de manière précoce au cours du développement embryonnaire, soit à partir du stade 8 cellules (jour E2.5) (Niakan *et al.*, 2006). La crête génitale bi-potentielle exprime *Dax1* juste après l'expression de *Sfl*. Cette expression augmente dans les cellules de Sertoli de la gonade XY jusqu'aux environs du jour E12, soit au début de la différenciation sexuelle, où elle décroît rapidement pour augmenter dans les cellules interstitielles entre les jours E13,5 et E14,5 pour à nouveau être réprimée dans la gonade mâle (Ikeda *et al.*, 2001; Swain *et al.*, 1996). Ce résultat suggère que *DAX1* pourrait être un important déterminant ovarien. De plus, des études *in vitro* réalisées sur des gonades XX ont montré que la transcription de *Dax1* est activée par la β -caténine, effecteur de la voie Wnt canonique menant à la différenciation de la voie femelle, en synergie avec SF1. Pourtant des expériences menées sur des souris transgéniques ont démontré le contraire. Par exemple, les femelles *Dax1* nulles ont un phénotype normal tandis que les mâles hétérozygotes pour le gène sont stériles en raison d'une perte complète des cellules germinales à l'âge de 14 semaines (Yu *et al.*, 1998), ce qui démontre le rôle essentiel de *DAX1* pour le développement des testicules. Un seuil minimal de *DAX1* est donc requis pour la fonction testiculaire normale alors que sa surexpression a un effet anti-masculinisant (Ludbrook et Harley, 2004). Une chose est certaine, le mode d'action précis de *DAX1* au cours du développement des gonades demeure toujours à élucider.

3.3.7 SOX9

SOX9 (SRY-related HMG box gene 9) est un facteur de transcription jouant de multiples rôles au cours de l'organogenèse. Il est entre autre essentiel à la formation du cartilage et de la moelle épinière (Bi *et al.*, 1999; Stolt *et al.*, 2003). Le gène *SOX9* humain de 5,4 kb, tout comme le gène *SRY* est très conservé parmi les vertébrés. Il est constitué de trois exons et code pour une protéine de 509 acides aminés. Chez la souris, l'expression de *Sox9*, initialement détectée dans la crête génitale, est régulée à la hausse dans les cellules pre-Sertoli au stade E11,5 correspondant au pic d'expression de *Sry* alors que son expression est régulée à la baisse dans l'ovaire (De Santa Barbara *et al.*, 2000). *SOX9* est également capable de s'autoréguler (Sekido et Lovell-Badge, 2008). Par ailleurs, le gène *Amh* codant pour l'hormone anti-Müllérienne, une hormone peptidique responsable de la régression des canaux de Müller est une cible potentielle de *SOX9* depuis que des études *in vitro* ont révélé que *SOX9* peut se lier à un motif *SOX* localisés dans la région proximale du promoteur de *Amh* (De Santa Barbara *et al.*, 1998).

Des évidences suggèrent que *SRY* et *SOX9* coopèrent à la différenciation de la voie mâle. En effet, chez l'homme, l'haploinsuffisance résultant des mutations hétérozygotes de *SOX9* cause une pathologie rare appelée dysplasie campomélique qui se caractérise par une malformation du cartilage et des os. Les patients masculins souffrant de dysplasie campomélique présentent dans la majorité des cas une dysgénésie gonadique plus ou moins importante tandis que le développement ovarien des patientes atteintes n'est pas affecté (Foster *et al.*, 1994). Chez la souris par exemple, l'expression ectopique de *Sox9* dans des gonades XX indifférenciée induit la formation de testicules mais ce mâle XX n'exprimant pas *Sry* demeure stérile (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001). Inversement, l'inactivation de *Sox9* à un stade en amont de la détermination du sexe entraîne une réversion sexuelle XY (Barrionuevo *et al.*, 2006; Chaboissier *et al.*, 2004). L'ensemble de ces expériences démontrent qu'en absence de *Sry*, l'expression de *Sox9* est à la fois nécessaire et suffisante pour initier le développement testiculaire.

3.3.8 AMH

Dès 1954, l'observation de la régression des canaux de Müller chez des fœtus XY a permis de postuler sur l'existence d'une seconde hormone foetale nommée AMH (Hormone anti-Müllérienne) ou MIS (Müllerian-inhibiting substance), différente de la testostérone (Jost, 1954). Le gène *AMH* humain dispose de cinq exons (Cate *et al.*, 1986). Il est exprimé précocement dans les gonades des deux sexes au moment de la détermination du sexe puis son expression devient mâle spécifique à la 7^e semaine de gestation quand les cellules de Sertoli se différencient et que les cordons testiculaires sont formés. Des hauts niveaux d'expression d'*Amh* sont maintenus jusqu'à la puberté où ils diminuent graduellement (De Santa Barbara *et al.*, 2000).

Chez la souris, la crête génitale n'exprime pas *Amh*. Chez les mâles, l'expression d'*Amh* par les cellules pré-Sertoli débute au stade E12,5 coïncidant avec l'amorce de la différenciation des testicules. Cette expression est également maintenue durant le développement jusqu'à la puberté. Au cours du développement ovarien, l'expression d'*Amh* n'est pas détectée. Par contre, pour des raisons encore inconnues, des faibles niveaux de transcrits sont présents dans les cellules folliculaires durant toute la période de fertilité (Munsterberg et Lovell-Badge, 1991), ce qui fait de AMH est un marqueur de la réserve folliculaire ovarienne.

L'expression d'*Amh* est régulée par plusieurs intervenants à diverses étapes allant de la détermination du sexe, au développement des gonades ainsi qu'à leur maturation. Ainsi, il est connu que SF1 est directement impliquée dans l'activation du promoteur de *Amh* en coopération avec WT1, SOX9, GATA4 et SOX8 (Chaboissier *et al.*, 2004; Tremblay et Viger, 1999).

3.4 Détermination et différenciation de la voie femelle

En absence d'expression du gène *Sry*, ou si *Sry* ne s'exprime pas dans la fenêtre temporelle requise, l'expression de *Sox9* n'est pas induite et celle de *Fgf9* est réprimée au contraire de *Wnt4* qui est secrété par les cellules pré-granulosa, dont les niveaux d'expression vont culminer. WNT4 agira ensuite pour maintenir à la baisse les niveaux

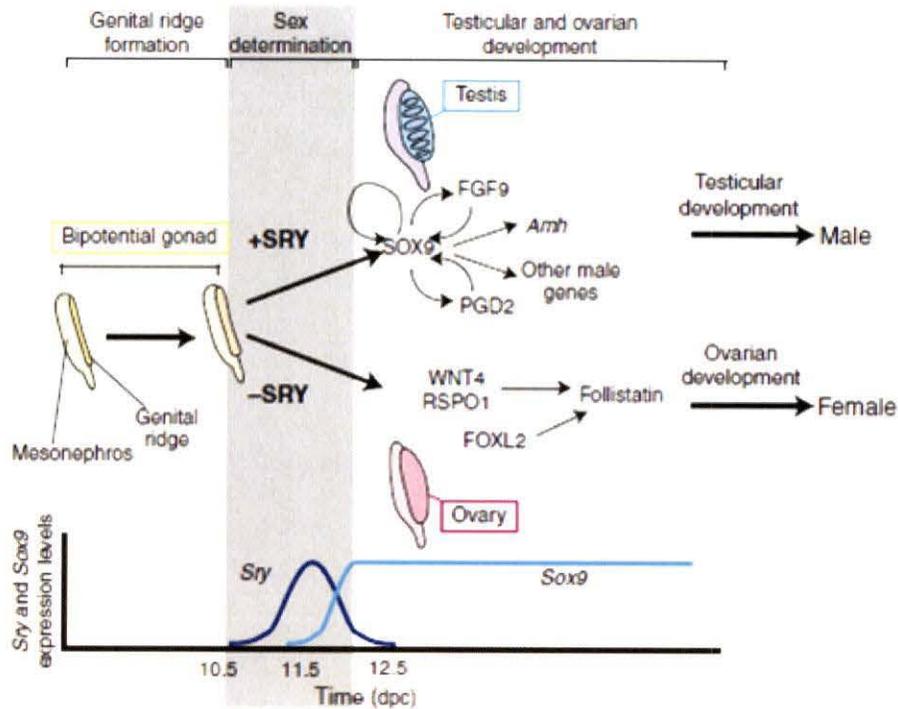


Figure 1.6 Cascade moléculaire de la détermination et la différenciation du sexe chez la souris

Au cours de l'embryogenèse, la crête génitale engendre la gonade bi-potentielle autour du jour E10,5. Dans les cellules somatiques XY, l'expression de *Sry* (courbe bleu foncé) débute à E10,5, atteint son pic à E11,5 et diminue après E12,5. Après quelques heures, l'expression de *Sox9* est ensuite régulée à la hausse (bleu clair) pour induire la différenciation des cellules de Sertoli. L'expression de *Sox9* atteint son pic entre E11,5-12,5, se poursuit jusqu'après la naissance et est maintenue par une série de boucles de régulation positive (incluant FGF9, les prostaglandines D2 et SOX9 lui-même). Par la suite SOX9 active plusieurs gènes mâles spécifiques incluant *Amh*. Au stade E12,5 les cordons testiculaires sont formés et les testicules (bleu) se distinguent nettement des ovaires (rose). En absence de SRY, le programme d'expression des gènes femelles tels que *Wnt4*, *Rspo1* and *Foxl2* est activé pour induire le développement des ovaires caractérisé par l'expression de la follistatine ainsi que d'autres gènes spécifique de la voie femelle. Tiré de Kashimada et Koopman (2010).

d'expression de *Fgf9* et *Sox9* entraînant ainsi la différenciation des ovaires sous l'action cruciale de la voie Wnt canonique (Wnt/ β -caténine) co-activée par la *Rspo1* (R-spondine 1) (Chassot *et al.*, 2008). Dans le même temps, le canal mésonéphrique se dégénère tandis que le canal paramésonéphrique prolifère et se différencie pour générer les trompes de Fallope, l'utérus et la partie supérieure du vagin. Au contraire des testicules dont les cordons testiculaires se forment à partir du jour E12,5 chez la souris, les follicules ovariens constituant l'unité fonctionnelle des ovaires ne se différencient qu'après la naissance. Cette longue phase de dormance est consécutive à l'entrée en méiose des cellules germinales au stade E12,5-E13,5 et se caractérise par une absence de changement morphologique majeure de la gonade femelle. Cependant, le programme d'expression des gènes femelles demeure actif et est détectable à partir du jour E11,5 (Jorgensen et Gao, 2005; Menke *et al.*, 2003; Yao, H. H. *et al.*, 2004).

3.5 Gènes clés de la différenciation des cellules somatiques femelles

Des expériences de perte et gain de fonction ont permis d'établir le rôle de la voie Wnt canonique dans la détermination du sexe et plus spécifiquement dans la différenciation des ovaires. Ainsi, l'inactivation spécifique de la β -caténine dans des cellules somatiques ovariennes SF1 positives entraîne chez les mutants des défauts ovariens comparables à ceux observés chez des souris invalidées pour *Wnt4* et *Rspo1* (Liu *et al.*, 2009; Manuylov *et al.*, 2008). De plus, l'expression ectopique de β -caténine constitutivement active chez des embryons XX délétés à la fois pour les gènes *Wnt4* et *Rspo1* restaure le développement normal des ovaires (Chassot *et al.*, 2008; Liu, Parker, *et al.*, 2010). Enfin, il a aussi été démontré que WNT4 et RSPO1 sont capables d'activer la β -caténine *in vitro* (Binnerts *et al.*, 2007; Kim, K. A. *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2007). La recherche effrénée d'un déterminant femelle à l'image de SRY a conduit à l'identification de plusieurs gènes clés spécifiques de la voie femelle dont nous dressons ici une liste non exhaustive.

3.5.1 *WNT4*

WNT4 appartient à la grande famille des protéines WNT (Wingless-related MMTV integration site), molécules de signalisation qui sont impliquées dans de multiples fonctions au cours du développement. Des duplications de la région distale du chromosome 1 où est localisé *WNT4* ont été retrouvées chez des patients humains souffrant de diverses anomalies sexuelles incluant la réversion sexuelle mâle-femelle (Jordan *et al.*, 2001). *WNT4* est détecté très précocement au cours du développement, il est exprimé dans les cellules mésenchymateuses du mésonéphros avant la formation de la crête génitale. Son expression est ensuite maintenue dans les cellules somatiques (cellules pré-granulosa) de la crête génitale jusqu'au jour E11,5 à partir duquel son expression connaît un dimorphisme sexuel en faveur de la voie femelle (Vainio *et al.*, 1999). Des souris femelles invalidées pour *Wnt4* meurent d'insuffisance rénale juste après leur naissance tandis que leur tractus génital est totalement masculinisé et dominé par la présence de structures Wolffiennes, l'expression de marqueurs et d'enzymes stéroïdogéniques spécifiques de la différenciation mâle (Kim, Y. *et al.*, 2006a). *Wnt4* peut être négativement régulé par SOX9 puisque des gonades XY portant une ablation conditionnelle de *Sox9* montrent l'expression de *Wnt4* (Barrionuevo *et al.*, 2006) et que l'expression ectopique de *Sox9* dans des gonades XX induit une régulation à la baisse de l'expression de *Wnt4* (Qin et Bishop, 2005). De plus, l'expression de *Wnt4* est régulée à la hausse chez des souris *Sox9* ou *Fgf9* nulles, ce qui soutient l'hypothèse que WNT4 et FGF9 agissent comme des signaux antagonistes au cours de la détermination du sexe (Kim, Y. et Capel, 2006; Kim, Y. *et al.*, 2006a).

3.5.2 *RSPO1*

La R-spondine 1 est membre d'une petite famille de protéines sécrétées (RSPO1-4) qui agissent comme co-activateurs pour la voie WNT canonique (Kamata *et al.*, 2004; Nam *et al.*, 2006). Les mutations du gène *RSPO1* localisé sur le chromosome 1 chez l'humain, sont associées non seulement à l'hyperkératose palmoplantaire mais aussi à la réversion sexuelle femelle-mâle (Parma *et al.*, 2006). Notons que la surexpression de

Rspo1 chez des souris mâles XY n'affecte pas le développement des testicules (Buscara *et al.*, 2009). De façon intéressante, des souris femelles XX invalidées pour *Rspo1* récapitulent le phénotype de souris XX *Wnt4* nulles caractérisé par une réversion sexuelle incomplète et un tractus génital masculinisé où prédomine les structures Wolffiennes (Chassot *et al.*, 2008; Tomizuka *et al.*, 2008). Parma *et al.* spéculent d'ailleurs que la RSPO1 agit en synergie avec WNT4 dans les gonades XX pour stabiliser la β -caténine (Parma *et al.*, 2006). Enfin d'autres auteurs soutiennent que RSPO1 est le facteur décisif qui fait pencher la balance vers la voie femelle au cours de la différenciation sexuelle chez les mammifères (Capel, 2006).

3.5.3 FOXL2

L'association potentielle de *Foxl2* avec certaines formes de réversion sexuelle femelle-mâle lui a conféré le statut de gène déterminant femelle. Par ailleurs des patientes humaines portant des mutations de *FOXL2* présentent un défaut précoce du développement ovarien (Crisponi *et al.*, 2001; Pailhoux *et al.*, 2001). Chez la souris, l'expression de *Foxl2* débute autour du stade E11,5 quand les cellules folliculaires nouvellement formées entament leur différenciation (Wilhelm *et al.*, 2009). Toutefois, la déficience de *Foxl2* chez la souris entraîne un défaut des ovaires au stade adulte (Schmidt *et al.*, 2004), mais n'affecte pas leur développement précoce (Ottolenghi *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2004). Ce qui rend peu probable la possibilité que *Foxl2* soit le facteur déterminant de la voie femelle bien qu'il semble essentiel au maintien de l'identité des cellules somatiques. Il a été rapporté que l'ablation conditionnelle de *Foxl2* dans les follicules d'ovaires adultes conduit à une augmentation des niveaux d'expression de *Sox9* qui s'accompagnent d'une trans-différenciation des cellules de la granulosa en cellules de Sertoli ainsi qu'à l'apparition de cellules et structures testiculaires (Uhlenhaut *et al.*, 2009). FOXL2 peut également réprimer directement l'expression de *Sox9* via son enhancer testicule spécifique TESCO (Sekido et Lovell-Badge, 2008) en interagissant avec les récepteurs α et β des œstrogènes (Uhlenhaut *et al.*, 2009). D'où émane l'hypothèse selon laquelle l'expression de *Sox9* est continuellement réprimée chez une

souris XX grâce aux actions successives de la voie Wnt canonique au stade embryonnaire et de Foxl2/ER α - β durant l'âge adulte (Sinclair, A. et Smith, 2009).

Tableau 1.1 Gènes impliqués dans la détermination et la différenciation du sexe chez la souris (liste non exhaustive excluant les gènes *Gata*)

Gènes	Site d'expression	Fonction de la protéine	Phénotype causé par l'inactivation du gène
<i>SF1</i>	crête génitale	Récepteur nucléaire/facteur de transcription	Échec de formation de la crête génitale
<i>Wt1</i>	crête génitale	Facteur de transcription	Échec de formation de la crête génitale
<i>Sry</i>	testicule	Facteur de transcription	Réversion sexuelle mâle/femelle
<i>Fgf9</i>	testicule	Molécule de signalisation	Réversion sexuelle mâle/femelle avec défaut de cellules de Sertoli
<i>DMRT1</i>	testicule	Facteur de transcription	Défaut du développement des testicules avec perte de cellules de Sertoli et germinales
<i>Sox9</i>	testicule	Facteur de transcription	Réversion sexuelle mâle/femelle
<i>Amh</i>	testicule	Hormone peptidique	Pseudohermaphrodisme mâle
<i>Wnt4</i>	ovaire	Ligand	Absence de formation des voies Müllériennes
<i>Rspo1</i>	ovaire	Molécule de signalisation	Réversion sexuelle partielle femelle/mâle
<i>Fst</i>	ovaire	Inhibiteur de l'activine	Réversion sexuelle partielle femelle/mâle
<i>Foxl2</i>	ovaire	Facteur de transcription	Échec prématuré de la formation des ovaires

3.5.4 FST

Le gène *Fst* localisé sur le chromosome 5 encode pour la follistatine, une molécule de signalisation sécrétée par les cellules interstitielles des gonades et exprimée au cours du développement ovarien chez la souris (Yao, H. H. *et al.*, 2004). L'expression de *Fst* est absente chez les souris homozygotes invalidées pour *Wnt4* alors que *Wnt4* est exprimé chez les souris portant deux copies mutées de *Fst*. Ce résultat suggère que le gène *Fst* agit en aval de *Wnt4* dans la voie de développement des ovaires (Menke et Page, 2002; Yao, H. H. *et al.*, 2004). Vu que la perte de fonction de *Wnt4* ou *Fst* conduit à la formation ectopique de vaisseaux cœlomiques dans l'ovaire fœtal (Vainio *et al.*, 1999; Yao, H. H. *et al.*, 2004), la fonction principale de *Fst* serait donc d'inhiber la migration des cellules du mésonephros à l'intérieur de la gonade empêchant de cette façon la mise en place de la vasculature testiculaire. Cette hypothèse est corroborée par le fait que *Fst* inhibe la formation de vasculature de type testiculaire en agissant comme antagoniste de l'activine B qui induit probablement la migration des cellules du mésonephros dans les testicules (Yao, H. H. C. *et al.*, 2006).

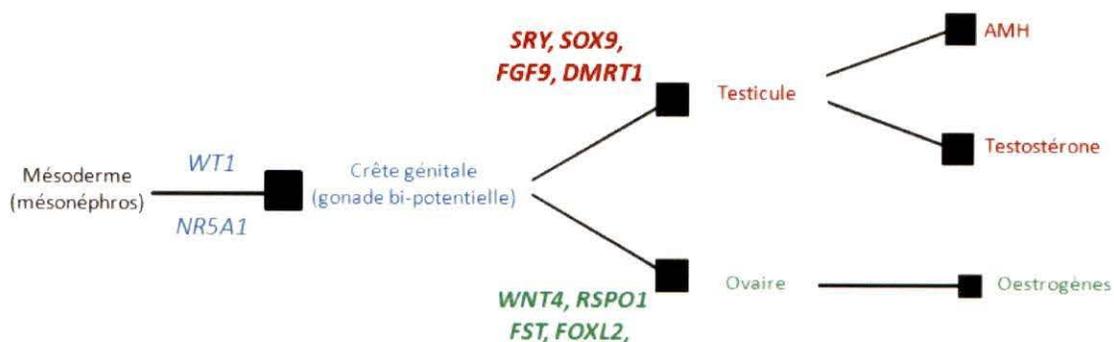


Figure 1.7 Gènes impliqués dans la détermination du sexe et la différenciation des gonades (excluant les gènes *GATA*)

Cette image résume de façon simplifiée l'ordre d'expression des gènes à chacune des différentes étapes du développement gonadique chez l'homme et la souris. Adapté de (Kucinkas et Just, 2005).

IV- LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GATA

4.1 Les facteurs GATA chez les vertébrés

Les facteurs GATA sont des régulateurs transcriptionnels qui reconnaissent et se lient spécifiquement au motif consensus de liaison à l'ADN de type (A/T)/GATA/(A/G) dans la région promotrice des gènes cibles dont ils modulent l'expression (Evans, 1997; Orkin, 1992). Les eucaryotes de tous les règnes expriment des facteurs GATA et leur nombre varie d'un groupe à l'autre et d'une espèce à l'autre (Lowry et Atchley, 2000). Chez les vertébrés, 6 facteurs GATA sont exprimés et dénommés GATA1 à GATA6. Ces facteurs régulent le développement et la différenciation d'une variété de tissus en agissant comme régulateurs transcriptionnels. On les divise en deux groupes en fonction de leur homologie de séquence en acides aminés et leur profil d'expression (Molkentin, 2000): le groupe hématopoïétique, qui comprend les facteurs GATA1, GATA2 et GATA3 ainsi que le groupe cardiaque qui inclut les facteurs GATA4, GATA5 et GATA6 (figure 1).

Les facteurs du groupe hématopoïétique sont préférentiellement exprimés dans le système nerveux, les cellules hématopoïétiques avec notamment GATA1, 2 dans les mastocytes et mégacaryocytes puis GATA3 particulièrement dans les lymphocytes T (Orkin, 1992). Ces facteurs sont également exprimés dans d'autres tissus et cellules incluant l'oreille interne (Orkin, 1998), les cellules endothéliales, les fibroblastes, les canaux de Wolff, l'hypophyse, le cerveau et le foie embryonnaires (Dasen *et al.*, 1999; Gordon *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1990; Zhou, Y. *et al.*, 1998), le placenta, le foie, les reins et le thymus (Ko *et al.*, 1991). L'expression de *GATA1* bien que restreinte s'étend aussi jusqu'aux testicules (Ito *et al.*, 1993; Viger *et al.*, 1998; Yomogida *et al.*, 1994).

Les facteurs GATA4, 5 et 6 constituant le groupe cardiaque sont impliqués dans l'organogenèse, plus spécifiquement dans le développement des organes dérivant de l'endoderme et du mésoderme tels que le cœur, les gonades, le foie, l'estomac, les poumons, le pancréas, les intestins et les glandes surrénales (Arceci *et al.*, 1993; Heikinheimo *et al.*, 1994; Ketola *et al.*, 1999; Viger *et al.*, 1998).

L'expression de *GATA4* est détectée à partir du développement embryonnaire précoce dans le cœur et se maintient dans le cœur adulte (Heikinheimo *et al.*, 1994; Kelley *et al.*, 1993), les crêtes génitales (Ketola *et al.*, 2000; Ketola *et al.*, 1999; Lavoie *et al.*, 2004; Viger *et al.*, 1998) puis dans les intestins, le foie, les poumons et les gonades (Arceci *et al.*, 1993; Laverriere *et al.*, 1994) où cette expression est maintenue pendant toute la vie. Le facteur GATA5 est quant à lui présent dans le cœur et par la suite dans les poumons, la crête urogénitale et l'épithélium intestinal (Molkentin, 2000). L'expression de *GATA5* se poursuit dans l'intestin, l'estomac, la vessie et les poumons au niveau post-natal. Le profil d'expression de *GATA6* est similaire à celui de *GATA4* pendant le développement embryonnaire précoce et après la naissance, GATA6 se retrouve dans le cœur, l'intestin, la vessie et les gonades (Morrisey *et al.*, 1996).

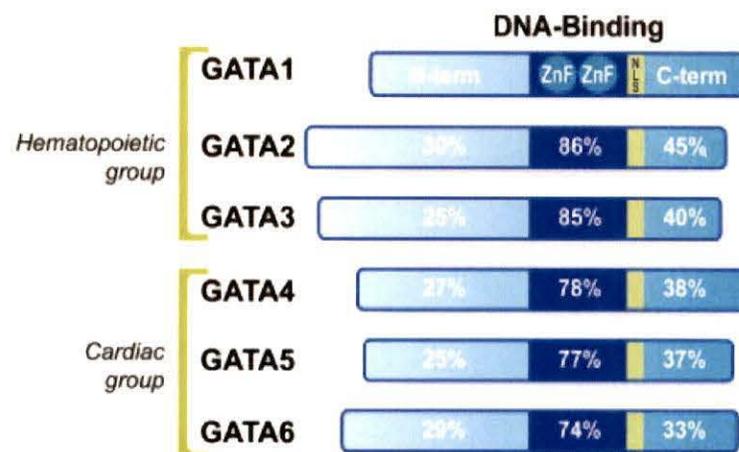


Figure 1.8 Structure et homologie des protéines GATA chez les vertébrés

Les facteurs GATA sont caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN contenant deux motifs en doigts de zinc (ZnF) impliqués dans l'interaction des GATA avec des co-facteurs ou d'autres partenaires transcriptionnels. Les domaines de transactivation sont situés de part et d'autre du domaine de liaison à l'ADN. Le pourcentage d'homologie des domaines en doigts de zinc ainsi que celui des domaines N et C-terminaux des différentes protéines GATA (dédit à partir des séquences chez la souris) est également indiqué. NLS: signal de localisation nucléaire. Tiré de Viger *et al.* (2008).

4.2 Organisation structurale et fonctionnelle de la protéine GATA4

Les protéines GATA détiennent en commun un domaine composé de deux motifs en doigt de zinc adjacents (figure 1.8) qui dirigent la liaison de la protéine au motif GATA situé au niveau des promoteurs des gènes cibles (Evans et Felsenfeld, 1989). De plus, les protéines GATA partagent une forte homologie variant de 75-85% dans la séquence en acides aminés à l'intérieur du domaine en doigt de zinc (Pikkarainen *et al.*, 2004). Cette forte homologie entre les facteurs GATA explique d'ailleurs la redondance fonctionnelle qu'on observe chez certains mutants exprimant une délétion pour l'un ou l'autre de ses facteurs (Peterkin *et al.*, 2007; Holtzinger et Evans, 2007). Des analyses de délétion, ont démontré que le motif en doigt de zinc situé dans la portion C-terminale est suffisant et nécessaire pour la liaison à l'ADN (Morrisey *et al.*, 1997). Le motif en C-terminal est également le site des interactions protéine-protéine des facteurs GATA. Le motif en doigt de zinc N-terminal joue un rôle dans la stabilité et la spécificité de la liaison de la protéine à l'ADN (Whyatt *et al.*, 1993; Yang et Evans, 1992). Il constitue le site d'interaction avec les facteurs de transcription FOG (Friend of GATA). Deux domaines de transactivation de la transcription ont été identifiés de part et d'autres des doigts de zinc, de même qu'un signal de localisation nucléaire (NLS) situé dans le domaine de liaison à l'ADN (domaine basique adjacent au motif en doigt de zinc de la portion C-terminale) (Morrisey *et al.*, 1997). Ce NLS facilite l'import nucléaire de GATA4 via une voie non classique faisant intervenir l'importine β et le RanGTP (Philips *et al.*, 2007).

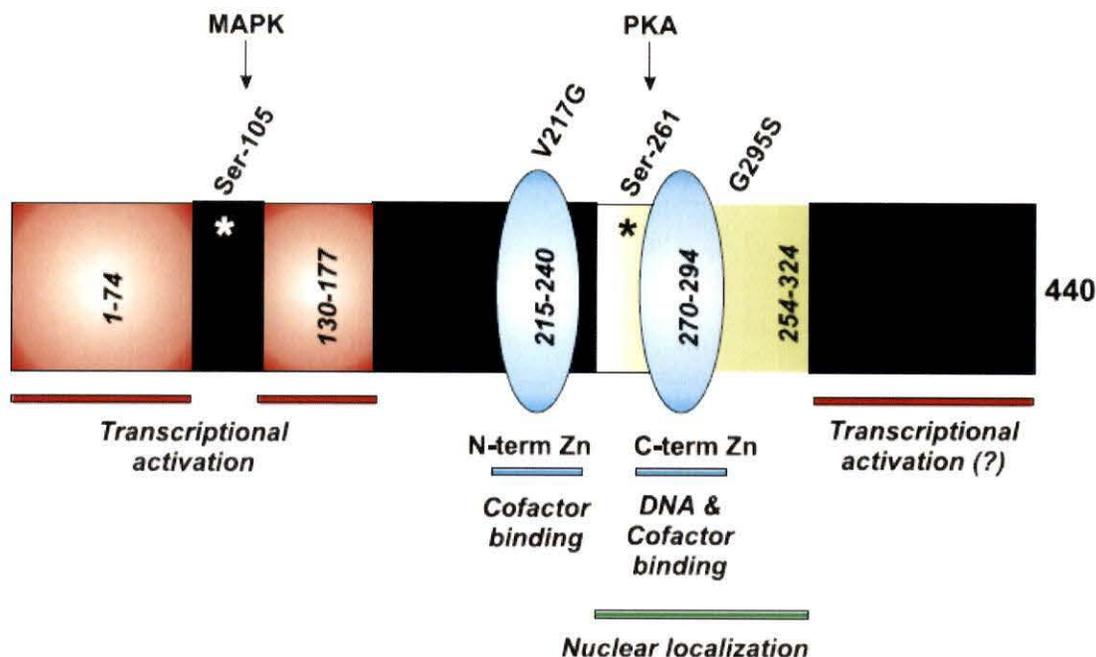


Figure 1.9 Structure de Gata4 chez la souris

Les domaines d'activation de la transcription sont identifiés en rouge; les domaines en doigts de zinc en bleu et en vert le domaine de liaison à l'ADN comprenant le signal de localisation nucléaire. *Présence des sérines 105 et 261, cibles de kinases cellulaires et conduisant à une activation maximale des promoteurs cibles de Gata4. Tiré de (Pikkarainen *et al.*, 2004).

4.3 Importance des gènes *Gata*

Malgré leur grande homologie et leur redondance fonctionnelle supposée, un facteur GATA ne compense pas toujours l'absence d'un autre. Ainsi, les souris *Gata1* (Fujiwara *et al.*, 1996) ou *Gata2* nulles (Tsal *et al.*, 1994) meurent d'anémie sévère entre les jours E10 et E11 alors que les souris *Gata3* ne survivent pas au delà du jour E12 car en plus de saignements internes massifs, ces souris souffrent de sévères difformités au niveau du cerveau, de la moelle épinière et présentent des retards de croissance marqués (Pandolfi *et al.*, 1995). Les souris conditionnellement invalidées pour *Gata1* par contre ne présentent aucun phénotype testiculaire et se reproduisent normalement (Lindeboom *et al.*, 2003). Les souris invalidées pour les gènes *Gata4* et *Gata6* meurent autour des jours

E9,5 et E7,5 respectivement à cause d'un défaut de fermeture du tube cardiaque et de la cavité abdominale (Kuo *et al.*, 1997; Molkentin *et al.*, 1997) ainsi que d'un défaut de formation de l'endoderme et de développement du tissu extra-embryonnaire (Koutsourakis *et al.*, 1999; Morrisey *et al.*, 1998). Finalement, Gata5 reste le seul facteur Gata chez la souris dont l'invalidation n'entraîne pas une létalité embryonnaire précoce. Par contre ces souris, bien que viables et sous-fertiles, présentent une malformation du tractus uro-génital femelle (Molkentin, 2000; Morrisey *et al.*, 1998).

Il apparaît donc clair que chacun des facteurs GATA possède une fonction critique depuis les étapes précoces du développement embryonnaire étant donné la létalité précoce et/ou les troubles développementaux graves associés à l'invalidation de chacun des facteurs et qu'un seuil minimal d'expression et/ou d'activité d'une protéine GATA particulière soit nécessaire pour atteindre sa pleine fonctionnalité (Xin *et al.*, 2006).

4.4 Les GATA exprimés dans les gonades

Chez les mammifères, quatre facteurs GATA (GATA1, -2, -4 et -6) sont présents dans les testicules alors que trois GATA (GATA2, 4 et 6) sont retrouvés dans l'ovaire. À l'exception de GATA2 dont on rapporte une expression exclusive dans les cellules germinales femelles pendant une étroite fenêtre au cours du développement embryonnaire (E11,5-E15,5) (Bhardwaj *et al.*, 2008; Siggers *et al.*, 2002), les trois autres GATA sont exprimés dans les populations des cellules somatiques (LaVoie, 2003; Viger *et al.*, 2004). GATA1 est exprimée dans les cellules de Sertoli au stade prépubère et adulte puis son expression apparaît négativement régulée par des facteurs produits par les cellules germinales (Viger *et al.*, 1998; Yomogida *et al.*, 1994). GATA4 et 6 sont tous les deux présentes dans les testicules et les ovaires (Heikinheimo *et al.*, 1997; Ketola *et al.*, 1999). Ces deux protéines sont très conservées à travers différentes espèces. Par exemple la protéine GATA4 chez la souris et l'humain partage 90% d'homologie dans leur séquence en acides aminés (Charron et Nemer, 1999). Les cellules de Sertoli expriment GATA4 depuis le début de leur différenciation jusqu'au stade adulte (Anttonen *et al.*, 2003; Ketola *et al.*, 1999; Lavoie *et al.*, 2004; Viger *et al.*, 1998). GATA6 est également présent

dans les cellules somatiques des deux sexes au stade foetal et son expression est maintenue au stade adulte (Ketola *et al.*, 1999; Ketola *et al.*, 2003; Lavoie *et al.*, 2004). D'ailleurs, la délétion conditionnelle de *Gata4* dans les cellules de Sertoli grâce au système Cre-LoxP a démontré que *Gata4* est un régulateur transcriptionnel majeur de la fonction des cellules de Sertoli au stade adulte chez la souris (Kyronlahti *et al.*, 2011). Les souris conditionnellement invalidées pour *Gata1* dans les testicules présentent un défaut de fertilité coïncidant avec un défaut de spermatogenèse menant à une diminution de la quantité et de la motilité des spermatozoïdes (Kyronlahti *et al.*, 2011).

GATA4 est exprimée de façon proéminente dans les cellules de la thèque interne (Anttonen *et al.*, 2003). GATA6 est exprimée dans les cellules somatiques et germinales de l'ovaire au cours du développement (Heikinheimo *et al.*, 1997; Lavoie *et al.*, 2004). GATA4 et GATA6 sont co-exprimées dans les cellules de la granulosa où elles reconnaissent des motifs de liaison identiques et régulent l'expression des mêmes gènes cibles (Divine *et al.*, 2004; Flück et Miller, 2004; Morrisey *et al.*, 1997) incluant ceux impliqués dans la folliculogenèse et la synthèse des stéroïdes, revue dans (Viger *et al.*, 2008). Les délétions conditionnelles de l'un ou l'autre de ces facteurs et des deux facteurs en même temps, réalisées spécifiquement dans les cellules de la granulosa grâce au système Cre-Lox ont montré que GATA4 et GATA6 sont cruciaux pour le fonctionnement normal de ces cellules (Bennett *et al.*, 2012). Ainsi, la perte d'expression de ces deux facteurs dans les cellules de la granulosa entraîne l'infertilité chez la souris. Toutefois, GATA4 et GATA6 ne contribuent pas de façon égale à la régulation de la fonction des ovaires. En effet, la délétion de GATA4 affecte un nombre de gènes cibles plus important par rapport à la délétion de GATA6. Le rôle de GATA4 apparaît donc prépondérant dans la régulation de la croissance et la maturation des follicules (Bennett *et al.*, 2013).

D'autre part, la caractérisation d'un modèle de souris transgénique exprimant un système de siRNA inductible dirigé contre *Gata4* a établi que GATA4 est impliquée de façon critique dans la fonction et l'intégrité des gonades (Thurisch *et al.*, 2009). Cependant, cette inhibition de l'expression de *Gata4* dans cette même étude a conduit à la

formation de tératomes ovariens chez 10% de femelles, supportant de fait un rôle de GATA4 comme suppresseur de tumeur dans l'ovaire (Thurisch *et al.*, 2009). Ce rôle comme suppresseur de tumeur a été confirmé par une étude récente utilisant des souris conditionnellement invalidées pour *Gata4* qui affichent un phénotype sévère caractérisé par un défaut de fertilité et la présence de kystes ovariens (Kyrönlahti *et al.*, 2011). GATA4 est de ce fait, un régulateur transcriptionnel clé de la fonction des cellules somatiques ovariennes chez les souris au stade fœtal et adulte (Kyrönlahti *et al.*, 2011).

V- RÔLE DE GATA4 DANS LA DÉTERMINATION DU SEXE ET LE DÉVELOPPEMENT DES GONADES

5.1 Interaction des protéines GATA et FOG

Les facteurs GATA sont exprimés dans plusieurs organes et tissus où ils interagissent avec une variété de partenaires de liaison. En effet, en plus de se fixer à l'ADN via leur domaine en doigt de zinc, les protéines GATA peuvent utiliser ces motifs en doigt de zinc en N ou C-terminal pour s'associer à différents co-facteurs. Il a ainsi été démontré que les facteurs FOG (friend of GATA) module l'activité des facteurs GATA en interagissant avec leur domaine en doigt de zinc N-terminal et que d'autres facteurs comme p300/CBP se lient via le domaine en doigt de zinc C-terminal (Blobel *et al.*, 1998; Cantor et Orkin, 2005; Dai et Markham, 2001; Tevosian *et al.*, 1999; Tsang *et al.*, 1997). Les protéines FOG possèdent de multiples doigts de zinc dont l'activité de liaison à l'ADN n'a pas encore été démontrée. Elles agissent comme co-activateurs et co-répresseurs des facteurs GATA spécifiques au tissu/cellule en fonction des gènes ciblés (Fossett *et al.*, 2001; Gaines *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 1997). Deux protéines FOG existent chez les mammifères: FOG1 et FOG2. Bien que ces deux protéines soient indispensables et jouent des rôles distincts au cours du développement cardiaque (Katz *et al.*, 2003; Tevosian *et al.*, 2000), seul FOG2 joue un rôle critique dans le développement des gonades (Tevosian *et al.*, 2002). *Fog2* est également exprimé dans d'autres tissus exprimant *Gata4* tels que le foie et même les tissus nerveux (Tevosian *et al.*, 2000). *Fog2*

et *Gata4* sont co-exprimés dans les cellules somatiques de la crête génitale XX et XY à partir du jour E10.5 (Anttonen *et al.*, 2003; Ketola *et al.*, 2002). Des études antérieures ont d'ailleurs démontré que l'expression de *Fog2* corrèle généralement avec celle de *Gata4* dans les deux sexes jusqu'au stade E13,5 quand l'expression de *Fog2* diminue dans le testicule fœtal (Anttonen *et al.*, 2003; Manuylov *et al.*, 2007). L'expression de *Gata4* et *Fog2* est évidente dans les cellules somatiques de l'ovaire fœtal tandis qu'au stade post-natal, *Fog2* est exprimé dans les cellules de la granulosa, les cellules de la thèque ainsi que dans les cellules lutéales (Anttonen *et al.*, 2003).

L'analyse des souris *Gata4*^{ki/ki} and *Fog2*^{-/-} ont établi l'importance *in vivo* de l'interaction GATA4-FOG2 dans la gonadogenèse (Crispino *et al.*, 2001; Tevosian *et al.*, 2002; Tevosian *et al.*, 2000). De façon intéressante, l'invalidation du gène *Fog2* est létale chez la souris entre les jours embryonnaires E12.5 et E15.5 en raison d'anomalies cardiaques complexes (Svensson *et al.*, 2000; Tevosian *et al.*, 2000). Les souris *Gata4*^{ki/ki} contenant un allèle muté (mutation ponctuelle du résidu valine en position 217 par une glycine) codant pour une protéine GATA4 incapable d'interagir avec FOG2 affichent un phénotype similaire à celui des embryons *Fog2*^{-/-} marqué par une létalité embryonnaire entre les jours E11.5 et E13.5 (Tevosian *et al.*, 2002). Ces mutants homozygotes *Gata4*^{Ki/Ki} et *Fog2*^{-/-}, survivent donc au delà du stade léthal E9,5 des souris *Gata4* nulles (Svensson *et al.*, 2000; Tevosian *et al.*, 2000) permettant ainsi d'évaluer le rôle de GATA4 dans le développement précoce des gonades en absence de FOG2.

5.2 Rôle de GATA4-FOG2 dans la détermination du sexe

La restauration partielle de la fonction cardiaque des souris *Fog2*^{-/-} à l'aide d'un transgène *Fog2* sous le contrôle du promoteur du gène *Myhca* codant pour la chaîne lourde de la myosine cardiaque, α MHCa permis le prolongement de viabilité des fœtus jusqu'au jour E17,5 (Tevosian *et al.*, 2000), stade où la différenciation sexuelle est complétée et le développement gonadique bien avancé. Ces embryons transgéniques *Fog2*^{-/-} ::myhca-*Fog2* autant mâles que femelles présentent des gonades anormales (Tevosian *et al.*, 2002). Les défauts gonadiques sont cependant plus marqués chez les

mutants XY dont les gonades sont dépourvues de cordons testiculaires, certainement dû à l'expression significativement réduite de *Sry* dans les cellules somatiques qui par ricochet ne se différencient pas en cellules de Sertoli (Tevosian *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent donc que l'interaction GATA4/FOG2 est nécessaire pour activer l'expression de *Sry*, permettant ainsi le déclenchement de toute la cascade moléculaire aboutissant à la détermination et à la différenciation sexuelle chez la souris.

De même, il a été observé que les gonades des souris *Fog2*^{-/-} *myhca-Fog2* tout comme celles des souris *Gata4*^{ki/ki} n'expriment ni l'hormone antimüllérienne (AMH) ni plusieurs enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, notamment la P450scc, la 17 α -hydroxylase/17-20 lyase et la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase. La différenciation des cellules stéroïdogéniques ainsi que l'expression des gènes codant pour les enzymes stéroïdogéniques tels que StAR, P450scc (*Cyp11a1*), Hsd3b1 et P450c17 (*Cyp17a1*) est également sous le contrôle du tandem GATA4/FOG2 (Tevosian *et al.*, 2002; Viger *et al.*, 2008).

5.3 GATA4-FOG2 dans la différenciation de la voie mâle

Des approches *in vitro* ont déjà montré que GATA4 régule aussi l'expression de gènes tels que *Sry* (Miyamoto, Y. *et al.*, 2008; Tevosian *et al.*, 2002), *Sox9* (Manuylov *et al.*, 2007), *Dmrt1* (Lei et Heckert, 2004) et *Amh* impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelle. Par ailleurs, l'expression d'*Amh* menant à la régression des canaux de Müller au cours de la différenciation testiculaire, est contrôlée par l'interaction GATA4-FOG2 en association avec le facteur SF1. En somme, toutes ces données démontrent que GATA4 et sa capacité à interagir avec FOG2 est essentielle pour la détermination et la différenciation des testicules.

La génération des lignées conditionnelles visant à circonscrire l'inactivation spatio-temporelle de GATA4/FOG2 a permis de déterminer les rôles séparés de GATA4 et FOG2 pendant la différenciation sexuelle. Dans cette optique, la caractérisation des souris *Gata4*^{SF} and *Fog2*^{SF} chez lesquelles *Gata4* et *Fog2* sont délétés de manière conditionnelle au Cre exprimé sous le contrôle du promoteur du gène *Sfl* dans les cellules

somatiques des gonades, a démontré que GATA4 est nécessaire pour la différenciation des testicules, l'expression de *Dmrt1* et pour la morphogenèse des cordons testiculaires alors que la perte de fonction de *Fog2* entraîne un blocage partiel de la différenciation de la voie mâle ainsi qu'une réversion sexuelle mâle/femelle (Manuylov *et al.*, 2011). Au delà de leur interaction, ces deux protéines possèdent des fonctions bien distinctes au cours du développement des testicules.

5.4 GATA4-FOG2 dans la différenciation de la voie femelle

L'interaction GATA4-FOG2 s'est révélé tout aussi cruciale pour le fonctionnement des ovaires depuis qu'il a été démontré que la perte de l'interaction GATA4-FOG2 observée chez les souris *Fog2*-nulles et *Gata4*^{ki/ki}, résulte non seulement à la perte de l'expression de *Fst* et à l'inactivation de *Wnt4*, mais entraîne également un blocage du développement ovarien associé à une altération drastique du programme d'expression des gènes femelles (*Spr2d*, *Foxl2*, *Gng13*) (Manuylov *et al.*, 2008). Cette même étude a révélé que l'absence d'interaction GATA4-FOG2 active ectopiquement DKK1 (inhibiteur sécrété de la voie WNT) dans l'ovaire, et que cette activation s'accompagne d'une perte d'expression de plusieurs gènes cibles de la voie WNT (Manuylov *et al.*, 2008). Une autre évidence de l'implication de GATA4-FOG2 dans le contrôle du développement ovarien provient du fait que l'expression du gène *Spr2d* (small proline-rich 2d) est régulée à la baisse dans les ovaires des souris *Gata4*^{ki/ki} et *Fog2*^{-/-} mais pas dans les ovaires déficientes en β -caténine fonctionnelle (Manuylov *et al.*, 2008). Les protéines de la famille *Spr2* jouent un rôle important dans le cycle oestral et l'implantation utérine chez la souris (Fujino *et al.*, 2007). *Gng13* appartient à la famille des protéines G et interagirait avec la *Rspondin1* et *WNT4* au cours de la différenciation des ovaires (Kazanskaya *et al.*, 2004). Certains de ces résultats suggèrent par conséquent que le complexe GATA4-FOG2 contrôle l'expansion de la voie femelle au moins en partie en réprimant l'expression de *Dkk1*, ce qui à son tour lève l'inhibition qu'il exerce sur la voie WNT canonique (Manuylov *et al.*, 2008).

Nonobstant, une étude récente a démontré que la régulation de la différenciation ovarienne suivant l'étape de la détermination du sexe dépend plus de GATA4 et non de FOG2. Ainsi, la délétion conditionnelle de *Gata4* à l'intérieur de l'ovaire affecte la prolifération des cellules de la granulosa, le recrutement des cellules de la thèque et entraîne la stérilité. On note également un défaut de développement folliculaire caractérisé par une réduction significative du nombre de follicules antraux dans le cortex ovarien ainsi que la formation de kystes ovariens. GATA4 mais pas FOG2, apparaît donc essentiel pour la régulation du processus de différenciation de l'ovaire (Efimenko *et al.*, 2013).

5.5 Devenir de FOG2 après la détermination du sexe

En dehors du contexte de la détermination sexuelle, FOG2 à l'instar de toutes les protéines FOG-like, posséderait plutôt une fonction répressive sur la régulation par GATA4 telle que suggérée par l'étude *in vitro* de la régulation de l'activité de différents promoteurs gonadiques par les protéines FOG et les facteurs GATA (Ketola *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2002). FOG2 interagit avec GATA3, 4, 5 et 6 via leur motif en doigt de zinc N-terminal pour réprimer l'activation transcriptionnelle GATA4-dépendante au niveau des promoteurs cibles (Anttonen *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 1999). La répression de l'activité transactivatrice de GATA4 par FOG2 est effectuée via le motif de répression FOG constitué par ses 12 premiers acides aminés (Lin, A. C. *et al.*, 2004; Svensson *et al.*, 2000). Ce motif de répression FOG interagit également avec les protéines MTA and RbAp, membres du complexe de remodelage du nucléosome et de déacétylation des histones (NuRD : nucleosome remodeling deacetylase complex) qui sont nécessaires pour renforcer cette répression transcriptionnelle médiée par FOG2 (Roche *et al.*, 2008).

Le gène *Amh* est une des cibles potentielles de la régulation négative de GATA4 par FOG2 vu que l'expression de FOG2 dans les cellules de Sertoli juste après la naissance chez la souris (Ketola *et al.*, 2002) coïncide avec la diminution de l'expression de l'hormone antimüllérienne (Munsterberg et Lovell-Badge, 1991; Shen *et al.*, 1994).

Cette même répression d'*Amh* par FOG2 a d'ailleurs été confirmée par des expériences de transfection transitoire réalisées dans des cultures primaires de cellules de Sertoli de rat nouveau-né (Tremblay *et al.*, 2001).

VI- RÔLE DE GATA4 DANS LA STÉROÏDOGÈNESE

6.1 Déroulement de la stéroïdogénèse

La stéroïdogénèse est le processus de synthèse des hormones stéroïdiennes qui joue un rôle crucial dans le contrôle de la fonction reproductrice. En effet, les hormones stéroïdiennes contribuent au bon développement du corps et à sa fonction; elles régulent la différenciation sexuelle au cours de la période fœtale, le développement des caractères sexuels secondaires à la puberté ainsi que le comportement sexuel et la fonction reproductrice chez l'adulte. Les gonades constituent la source majeure des stéroïdes ou hormones sexuelles bien que le cortex surrénalien, le placenta, et dans une moindre mesure, d'autres tissus contribuent à leur production à différentes phases de développement et à l'âge adulte (Svechnikov et Söder, 2008). Suivant leur sécrétion, les hormones stéroïdiennes, composés lipidiques dérivés du cholestérol sont acheminées vers les organes cibles à travers la circulation sanguine grâce à des protéines de transport spécifiques. De par leur nature hydrophobe, les hormones stéroïdiennes diffusent facilement à travers les membranes cellulaires. Dans le cytoplasme, elles se lient à leurs récepteurs spécifiques et peuvent être transloquées au noyau. Les récepteurs des hormones stéroïdiennes sont des régulateurs transcriptionnels qui sont activés par la liaison de leur ligand. Les hormones stéroïdiennes agissent donc en modulant l'expression génique dans les cellules qui expriment les récepteurs appropriés.

Les enzymes stéroïdogéniques constitués de plusieurs enzymes spécifiques de la famille du cytochrome P450, des hydroxystéroïdes déshydrogénases et des stéroïdes réductases, sont responsables de la biosynthèse à partir du cholestérol d'une gamme d'hormones stéroïdiennes notamment les corticostéroïdes incluant glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes, les progestagènes, les androgènes et les estrogènes (Miller, 1988).

L'étape initiale de la biogenèse des hormones stéroïdiennes est le transfert des molécules de cholestérol du cytoplasme des cellules vers les mitochondries. Ce transfert dans les mitochondries est assuré par des protéines de transfert telles que StAR (steroidogenic acute regulatory protein) dont l'expression est étroitement régulée. En effet, StAR est exprimée rapidement en réponse à la stimulation par les gonadotrophines (LH et FSH) qui induisent l'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA (Clark *et al.*, 1995).

La synthèse de novo de l'ensemble des hormones stéroïdiennes commence par la conversion du cholestérol en prégnénolone dans les mitochondries par l'enzyme P450scc (clivage de la chaîne latérale du cholestérol) codé par le gène *CYP11A1* qui ampute la molécule de cholestérol de sa chaîne latérale (Parker et Schimmer, 1995). P450scc est lié à la membrane interne de la mitochondrie et est exprimé dans tous les tissus stéroïdogéniques (Miller, 1988; Reincke *et al.*, 1998). La prégnénolone est ensuite convertie en progestérone par la 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3β -HSD) qui est trouvée à la fois dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique lisse. La 3β -HSD est largement distribuée dans les tissus et se compose de deux isoenzymes qui sont régulés de manière spécifique au tissu (Leers-Sucheta *et al.*, 1997; Simard *et al.*, 2005). La 3β -HSD de type 2 est principalement exprimée dans les tissus stéroïdogéniques tels que les surrénales, les testicules et l'ovaire, alors que le type 1 est exprimé dans le placenta et dans les tissus non-stéroïdogéniques. Les prégnénolones et la progestérone sont donc les précurseurs de toutes les autres hormones stéroïdiennes.

6.2 Stéroïdogénèse dans les testicules

Les testicules produisent des spermatozoïdes pour la procréation et des hormones stéroïdiennes afin d'assurer les fonctions sexuelles et reproductives. L'hormone folliculo-stimulante (FSH) stimule les cellules germinales mâles (ou spermatogonies) à se développer en spermatozoïdes matures, processus appelé la spermatogénèse. En effet, FSH se lie à son récepteur sur les cellules de Sertoli et stimule la voie de l'AMPc qui va mener à l'activation de divers facteurs nécessaires à une production de spermatozoïdes. L'hormone lutéinisante (LH) quant à elle se lie à son récepteur sur la membrane des

cellules de Leydig, ce dernier est également couplé à la voie de signalisation de l'AMPc afin de stimuler la production de testostérone *de novo* à partir du cholestérol. De concert avec les actions de la FSH, la testostérone est nécessaire pour la production optimale de spermatozoïdes ainsi que pour la fonction sexuelle. Ainsi donc chez le mâle, les androgènes sont synthétisés par les cellules de Leydig. La LH induit dans ces cellules l'expression des gènes encodant les différentes enzymes et déshydrogénases cytochrome P450 impliquées dans la synthèse de la testostérone, incluant la 17 α -hydroxylase/17-20 lyase (ou CYP17) qui détient une activité majeure puisqu'elle dirige la biosynthèse des stéroïdes vers les hormones sexuelles (Dharia *et al.*, 2004; Sasano *et al.*, 1989).

L'androstènedione qui est un androgène moins puissant est convertie en testostérone par la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD). L'équilibre entre ces deux androgènes dépend de l'activité et du type de 17 β -HSD présente. Dans les testicules, ce sont les 17 β -HSD de type 3 et 5, exprimés dans les cellules de Leydig, qui catalysent la conversion de l'androstènedione en testostérone (Mindnich *et al.*, 2004), alors que le type 2 exprimé au niveau de la prostate et du placenta par exemples, catalyse la réaction inverse (Luu-The *et al.*, 2001). En outre, les cellules de Leydig, de Sertoli ainsi que les cellules germinales expriment des bas niveaux d'aromatase, enzyme qui convertit la testostérone produite par les cellules de Leydig en œstradiol. Cette étape est nécessaire à une initiation satisfaisante de la spermatogenèse et à la mitose des spermatogonies (Carreau *et al.*, 2003). D'autre part, le plus puissant des androgènes endogènes, la dihydrotestostérone (DHT) dérive de la testostérone grâce à l'action de la 5 α -réductase stéroïde.

6.3 Stéroïdogenèse dans les ovaires

Le rôle principal des ovaires consiste en la production d'ovules en vue de la fécondation et en la sécrétion d'hormones stéroïdiennes pour mener à bien les fonctions sexuelles et reproductives. Les ovaires ne produiront cependant pas d'hormones stéroïdiennes avant la puberté. Le follicule ovarien contient deux types de cellules stéroïdogéniques (les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa) qui diffèrent par

leur équipement enzymatique. Les cellules de la granulosa sont dépourvues de P450c17 et ne peuvent donc synthétiser les androgènes, précurseurs des œstrogènes. Les cellules de la thèque possèdent un récepteur de la LH qui stimule la conversion du cholestérol en prégnénolone. La synthèse des estrogènes débute dans les cellules de la thèque des follicules ovariens où l'androstènedione et la testostérone sont exportés vers les cellules de la granulosa qui les convertis majoritairement en œstradiol grâce à l'action concertée de l'aromatase et les 17 β -HSD de type 1 et 7, qui catalysent la conversion de l'œstrone en œstradiol (Luu-The *et al.*, 2001; Mindnich *et al.*, 2004). Les cellules de la granulosa possèdent un récepteur de la FSH qui joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'activité aromatase. À la puberté, les estrogènes influencent le développement des caractères sexuels secondaires tels que la formation des glandes mammaires. Ils régulent également le cycle menstruel en promouvant la croissance et la maturation des follicules ainsi que l'ovulation. Plus tard au cours du cycle, la FSH induit le récepteur de la LH dans la granulosa du follicule pré-ovulatoire. La LH stimule alors la sécrétion de progestérone dont les taux vont augmenter après l'ovulation et la transformation des cellules de la granulosa en cellules lutéales. Le but ultime étant de préparer l'utérus à une éventuelle nidation ainsi que les glandes mammaires à la lactation. La production d'hormones sexuelles par les ovaires chute avec la ménopause clôturant ainsi la période de fertilité chez la femme.

6.4 GATA4 et stéroïdogénèse

Les facteurs GATA sont exprimés de façon proéminente dans une variété de tissus incluant les glandes surrénales et les gonades qui représentent les deux sources principales de production de stéroïdes, où ils jouent probablement un rôle essentiel dans la stéroïdogénèse. Ainsi, GATA4 et GATA6 sont fortement exprimés dans les glandes surrénales chez l'humain et la souris au stade fœtal puis l'expression de GATA4 est régulée à la baisse au stade post-natal tandis que celle de GATA6 demeure haute (Kiiveri *et al.*, 2002). En ce qui concerne les gonades, GATA4 et GATA6 sont exprimés dans les compartiments stéroïdogéniques de l'ovaire, notamment les cellules de la thèque au cours

du développement (Heikinheimo *et al.*, 1997; Laitinen *et al.*, 2000). Dans les testicules, l'expression de GATA4 est prédominante dans les cellules de Leydig au stade fœtal et post-natal (Ketola *et al.*, 2000; Ketola *et al.*, 1999; McCoard *et al.*, 2001; Viger *et al.*, 1998).

Différentes études *in vitro* ont déjà démontré que GATA4 est nécessaire pour l'expression d'un groupe de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (Bergeron *et al.*, 2015; Flück et Miller, 2004; Hiroi *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2009; Schrade *et al.*, 2015; Tremblay *et al.*, 2001). De surcroît et conformément à un rôle des facteurs GATA dans la régulation de la stéroïdogénèse, les promoteurs de plusieurs de ces gènes contiennent un ou plusieurs motifs consensus GATA. GATA4 est un des régulateurs possibles de l'expression de *StAR*. La présence dans le promoteur du gène *StAR* d'un élément de régulation par les facteurs GATA confirme cette hypothèse puisque GATA4 peut se lier à cet élément et activer significativement l'expression génique à partir de ce promoteur, en association avec d'autres régulateurs transcriptionnels (Hiroi *et al.*, 2004; Nishida *et al.*, 2008; Tremblay *et al.*, 2002; Tremblay et Viger, 2001).

Différentes voies de synthèse conduisent à la production des hormones sexuelles. Ces voies de synthèse impliquent généralement un même groupe d'enzymes incluant la 17 α -hydroxylase/17-20 lyase aussi nommée P450 CYP17, les enzymes 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénases (3 β HSD), la P450 CYP19A1 aromatasase ainsi que les enzymes 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases (17 β HSD).

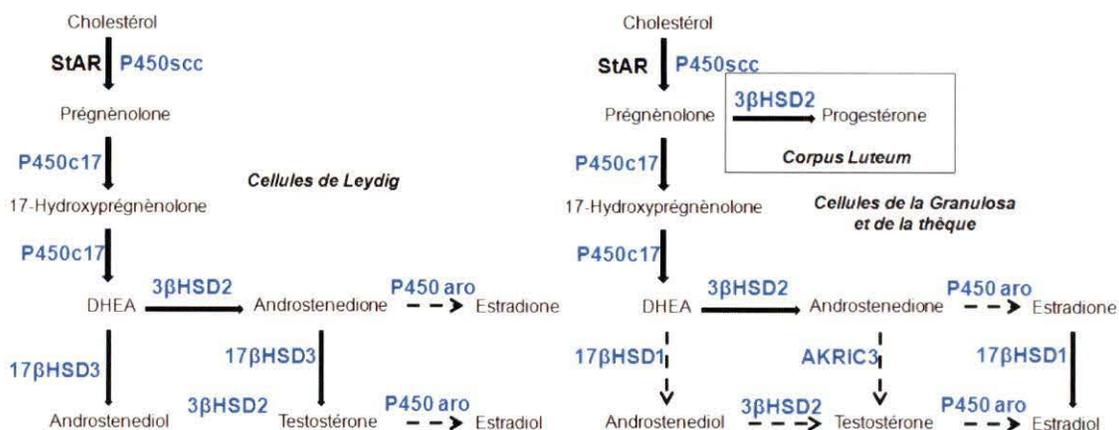


Figure 1.10 Principales voies de la stéroïdogénèse dans les gonades

Le cholestérol est converti en DHEA (déhydroépiandrostérone) par les mêmes enzymes utilisant des cofacteurs similaires aussi bien dans les cellules de Leydig (A) que dans les cellules de la thèque interne et de la granulosa (B). Les cellules de Leydig contiennent une quantité abondante de 17 β -HSD3 et peuvent produire de la testostérone efficacement à partir de l'androstenedione et l'androstenediol. Les cellules de la granulosa contiennent la P450-scc et convertissent le cholestérol en prégnénolone. Les cellules de la thèque expriment des faibles niveaux de P450-scc contre des niveaux élevés de P450C17 avec pour incidence l'acquisition de stéroïde en C₂₁ des cellules de la granulosa afin de produire les précurseurs des stéroïdes sexuelles en C₁₉. Vu que les cellules de la thèque ne contiennent pas d'aromatase, l'androstenedione repasse obligatoirement dans les cellules de la granulosa qui contiennent des quantités d'aromatase et de 17 β -HSD1 pour compléter la synthèse d'œstradiol. Cependant, dans la phase lutéale, la 3 β -HSD2 dans le corpus luteum convertit directement la prégnénolone nouvellement synthétisée en progéstérone. Les flèches en pointillés représentent toutes les voies mineures concourant au processus de stéroïdogénèse. Adapté de Miller et Auchus (2011).

De façon intéressante, plusieurs des gènes codant pour ces enzymes stéroïdogéniques sont des cibles potentielles des facteurs GATA dans les gonades. Et GATA4 joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'expression de ces gènes (Tevosian *et al.*, 2002). Il est par exemple rapporté que GATA4 régule positivement l'activité du gène *CYP19A1* qui code pour l'aromatase grâce à deux motifs de régulation pour les facteurs GATA présents dans son promoteur et qui sont très conservés chez les mammifères (Tremblay et Viger, 2001). Une autre étude réalisée chez l'humain a établi que l'activité du promoteur du gène humain *HSD3B2*, codant pour la 3BHSD de type 2, spécifiquement exprimée dans

les gonades et les glandes surrénales (Rhéaume *et al.*, 1991), est positivement modulée par GATA4 ou GATA6 *in vitro* (Martin *et al.*, 2005). Les facteurs GATA sont également des régulateurs majeurs de l'expression de la *P450c17* au cours de l'embryogenèse. En effet, à la suite d'expériences d'immuno-précipitation de la chromatine réalisées sur des cellules stéroïdogéniques (cellules MA-10), Shi *et al.* ont démontré que GATA4 et 6 se lient au promoteur et activent l'expression du gène *P450c17* chez le rat (Shi *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données font des facteurs GATA des régulateurs essentiels de l'expression et la fonction des gènes stéroïdogéniques (Bergeron *et al.*, 2015; Schrade *et al.*, 2015; Tremblay et Viger, 2003a).

6.5 Régulation de la stéroïdogénèse

L'axe hypothalamohypophysaire est le principal garant du système reproducteur. L'hypothalamus, considéré comme le chef d'orchestre du complexe hypothalamohypophysaire régule plusieurs fonctions essentielles de l'organisme par la sécrétion de différentes hormones et facteurs. L'une des hormones sécrétées par l'hypothalamus est la GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone). Une fois produite, la GnRH est acheminée vers l'hypophyse dans lequel se trouvent les récepteurs à GnRH qui vont induire la synthèse et la libération des gonadotropines. L'hypophyse ou glande pituitaire est l'autre structure qui constitue l'axe hypothalamo-hypophysaire. C'est une petite glande située au niveau d'une cavité dans l'os sphénoïde dénommée la selle turcique à la base de la cavité crânienne. L'hypophyse est composée de trois lobes: l'anté-hypophyse, le lobe intermédiaire et la post-hypophyse. La liaison de la GnRH à ses récepteurs au niveau des cellules de l'hypophyse stimule la synthèse et la libération des gonadotropines FSH et LH par les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse. La sécrétion de la LH et de la FSH se fait sous forme de pulse (qui a lieu toutes les 90 à 120 minutes) (Trussell, 2013). Les stéroïdes gonadiques en circulation régulent également l'action de la LH et FSH grâce à une boucle de rétroaction, revue dans (Shupnik, 1996). En effet, des faibles niveaux plasmatiques des stéroïdes sexuels induisent la production et la sécrétion des gonadotropines (rétroaction positive). Par ailleurs, lorsque les niveaux plasmatiques des

stéroïdes sexuels sont élevés, la production et la sécrétion des gonadotropines sont inhibées (rétroaction négative). Cette régulation par les stéroïdes sexuels se déroule de deux manières. Soit indirectement en stimulant ou inhibant la GnRH qui va par conséquent affecter la production des gonadotropines. Les stéroïdes sexuels peuvent également affecter la production de LH et FSH en ciblant directement l'hypophyse, revue dans (Shupnik, 1996).

Dans les testicules, la LH stimule la synthèse des androgènes, dont la testostérone, par les cellules de Leydig en se liant à son récepteur transmembranaire couplé à une protéine G (LHR), revue dans (Dufau, 1988). La FSH se lie à son récepteur transmembranaire couplé à une protéine G pour induire et maintenir la spermatogenèse en stimulant les cellules de Sertoli (Griswold, 1998; Simoni *et al.*, 1999). Les cellules de Sertoli sécrètent également l'activine qui exerce une rétroaction positive sur la sécrétion des gonadotropines et l'inhibine qui exerce une rétroaction négative (Carroll *et al.*, 1991; revue dans (Gregory et Kaiser, 2004)).

Dans les ovaires, la FSH active le recrutement et la croissance d'un follicule et donc stimule indirectement la sécrétion d'œstradiol par les cellules de la granulosa. La LH quand à elle stimule les cellules de la thèque interne qui sécrètent les androgènes. Le complexe hypothalamo-hypophysaire détecte les variations des taux sanguins d'hormones ovariennes et modifie son activité en fonction de ces taux. Ainsi, l'augmentation du taux d'œstrogène entraîne par rétrocontrôle négatif une diminution de la sécrétion de gonadostimulines. La production massive d'œstradiol par le follicule mûr sensibilise les cellules antéhypophysaires, ce qui déclenche une augmentation de la sécrétion des gonadostimulines (LH). Dans ce cas, on parle de rétrocontrôle positif. Les cellules de la granulosa sécrètent également l'inhibine et la progestérone qui à leur tour bloque la production de gonadostimulines par rétrocontrôle négatif (Burger et Robertson, 1997).

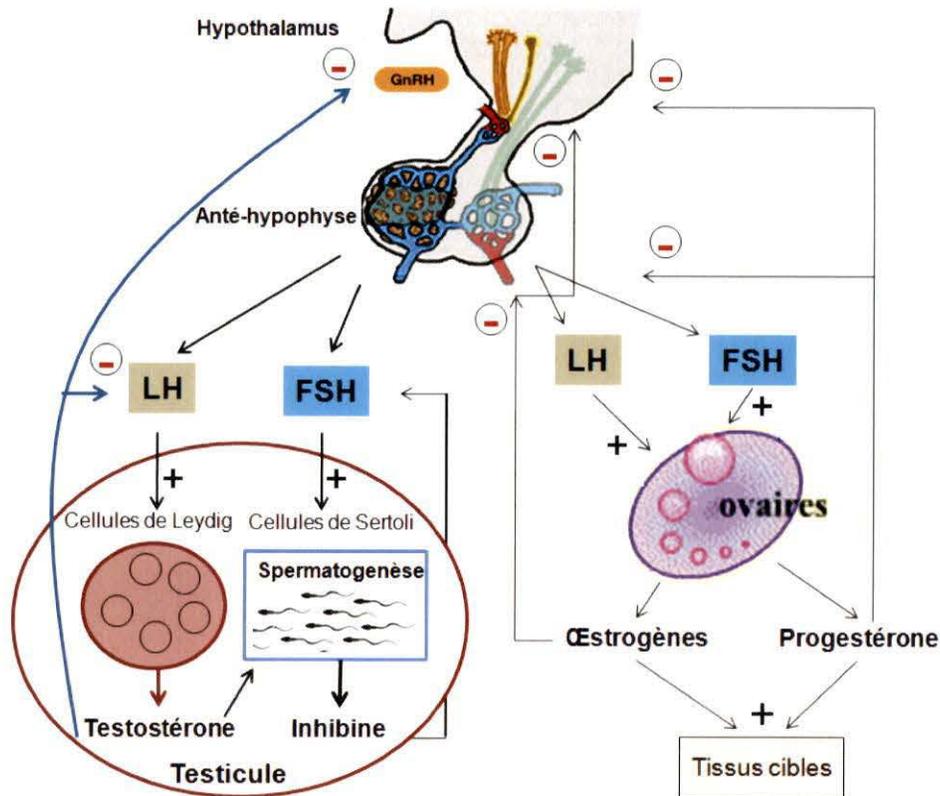


Figure 1.11 Régulation simplifiée de la stéroïdogénèse dans les gonades

Les fonctions des gonades sont régularées par le complexe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus sécrète la GnRH, qui active la sécrétion et la libération des gonatotropines (la LH et la FSH) au niveau de l'hypophyse. Dans le testicule, la LH et la FSH régularent la stéroïdogénèse dans cellules de Leydig et la spermatogénèse via les cellules de Sertoli. La FSH et la LH stimulent également les cellules endocrines de l'ovaire qui sécrètent deux types d'hormones : les oestrogènes (dont l'oestradiol), et la progestérone nécessaire à la formation du corps jaune. Ces différentes hormones agissent en rétroaction au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse pour induire ou limiter leur synthèse.

VII- EXPRESSION ET ACTIVITÉ DU FACTEUR GATA4 DANS LES GONADES

7.1 Régulation de l'expression de *Gata4*

Chez la souris, GATA4 est détectée avant l'étape de gastrulation (7^e jour embryonnaire) où il est fortement exprimé dans l'hypoblaste ou endoderme primitif et faiblement dans l'épiblaste autour du 4^e jour embryonnaire (Pilon *et al.*, 2008). Son expression est ensuite maintenue dans plusieurs tissus dérivés de ces structures ainsi que du mésoderme incluant le cœur, le foie, l'intestin, l'estomac, le pancréas, les glandes surrénales et les gonades (Arceci *et al.*, 1993; Heikinheimo *et al.*, 1994; Ketola *et al.*, 1999; Kiiveri *et al.*, 2002; Molkenin, 2000; Viger *et al.*, 1998). Des rôles vitaux de GATA4 pour les différentes étapes du développement du cœur ont d'ailleurs été démontré par des études de perte de fonction (Kuo *et al.*, 1997; Pu *et al.*, 2004; Watt *et al.*, 2004). Chez la souris, l'expression de *Gata4* a également été détectée au niveau des crêtes urogénitales vers le stade E9,75 (33 somites) (Hu *et al.*, 2013a; Mazaud Guittot *et al.*, 2007) et il semble être le seul facteur GATA exprimé dans les cellules somatiques des crêtes génitales au cours de la période de la détermination du sexe (autour des jours E10,5-11,5) (Anttonen *et al.*, 2003; Viger *et al.*, 1998). Une forte expression de *Gata4* persiste au cours du développement chez le mâle et est maintenue dans les cellules de Sertoli et de Leydig adultes. Chez la femelle par contre, l'expression de *Gata4* diminue légèrement suivant la détermination du sexe mais persiste dans les cellules de la granulosa et de la thèque au stade post-natal (Anttonen *et al.*, 2003).

Bien que le profil d'expression de *GATA4* au cours du développement soit établi, les mécanismes moléculaires qui contrôlent la transcription du gène demeurent mal compris. Outre l'absence de boîte TATA au niveau de leur promoteur, il est connu que la régulation de l'expression de chacun des gènes *GATA* est complexe et contrôlée par de multiples enhancers spécifiques aux tissus ainsi que par plusieurs exons 5' non traduits qui sont transcrits à partir de promoteurs distincts (Asnagli *et al.*, 2002; Burch, 2005; Mazaud Guittot *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012). Deux de ces exons non codants, E1a et E1b (Figure 1.11) sont abondamment exprimés dans les tissus qui expriment GATA4

notamment dans les gonades et sont hautement conservés parmi différentes espèces (Mazaud Guittot *et al.*, 2009). Ces deux transcrits sont générés à partir de deux promoteurs distincts et indépendants 1a et 1b dont l'organisation régule l'expression des transcrits respectifs (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014). Il est cependant intéressant de noter que les deux transcrits 1a et 1b contribuent tous les deux à la synthèse de la même protéine GATA4 (Mazaud Guittot *et al.*, 2009).

Les promoteurs générants les transcrits 1a et 1b ont des structures différentes. Le promoteur proximal 1a contient un motif Ebox (**CACGTG**) conservé (Mazaud Guittot *et al.*, 2007) ainsi qu'un site de liaison conservé pour les facteurs GATA localisé à 1 kb en amont et qui semble régulé par GATA6 et non GATA4 dans les cellules cardiaques (Ishibashi *et al.*, 2011). Le promoteur 1a est régulé par des facteurs ubiquitaires USF (Boulende Sab *et al.*, 2011; Mazaud Guittot *et al.*, 2007; Ohara *et al.*, 2006). Le promoteur distal 1b contient un motif Ebox-like, un site AP1-like, un site WT1 mais surtout deux sites de liaison pour les facteurs GATA qui contrôlent l'activité basale du promoteur (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014). Cette même étude révèle que contrairement au promoteur 1a, GATA4 lui-même se lie au promoteur 1b et interagit avec son partenaire FOG-2 pour réguler à la baisse l'activité de ce promoteur distal (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014) (figure 1.13).

Les études réalisées sur la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression de *Gata4* nécessitent de ce fait la caractérisation des séquences régulatrices situées en amont de ces premiers exons non codants (Ohara *et al.*, 2006). À cet égard, des études ont identifié pour la première fois chez le poisson zèbre la présence d'un élément régulateur localisé dans la région de 14,8 kb en amont de *Gata4* et suffisant pour diriger l'expression du transgène dans le cœur et le foie (Heicklen-Klein et Evans, 2004). Chez la souris, l'analyse des séquences non codantes conservées de la région distale a conduit à l'identification de deux enhancers localisés à 40 et 80kb en amont du site d'initiation du transcrit E1a de *Gata4* et suffisants pour diriger l'expression de façon plus large dans le mésoderme latéral et de manière plus restreinte au niveau du mésenchyme du foie (Rojas *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2009).

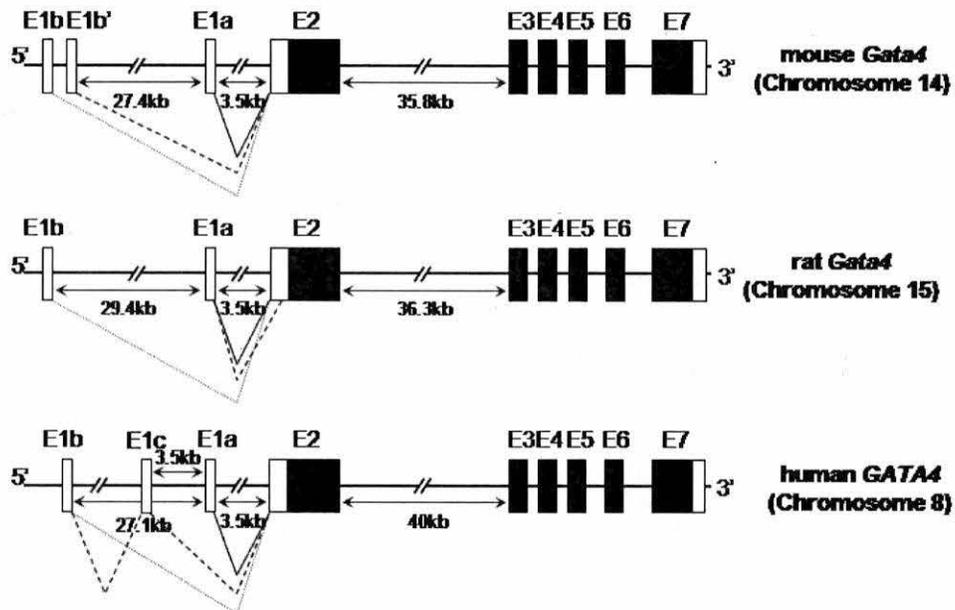


Figure 1.12 Organisation génomique de *Gata4*

Le gène *Gata4* est constitué de 7 exons. Les exons E1a et E1b sont conservés au sein des différentes espèces. E1a est localisé à 3,5 kb en amont du site d'initiation de la traduction situé dans l'exon 2. L'exon E1b se situe en moyenne à 28 kb plus en amont. Les lignes continues et pointillées représentent les possibles associations de l'exon 1 suivant le mécanisme d'épissage alternatif. Tiré de Mazaud Guittot *et al.* (2009).

Par la même approche, cette équipe a également identifié une séquence régulatrice complémentaire désigné *Gata4* G4, dans l'intron 2 qui contrôle l'expression de *Gata4* au niveau de l'endoderme définitif à des étapes précoces du développement embryonnaire (Rojas *et al.*, 2010). En ce qui concerne les gonades, des travaux antérieurs ont rapporté qu'un fragment de 5 kb du promoteur proximal de *Gata4* de rat en amont de l'exon 1a dirige l'expression du gène rapporteur spécifiquement dans les cellules de Sertoli du stade embryonnaire jusqu'au stade adulte (Mazaud Guittot *et al.*, 2007; Nel-Themaat *et al.*, 2011).

7.2 Le motif E-box

Le promoteur de *Gata4* à l'image de celui des autres gènes de la famille *Gata* ne contient pas de boîte TATA. Par contre, notre équipe (Mazaud Guittot *et al.*, 2007) a

identifié quatre motifs régulateurs dans les premiers 118 bp de la région proximale en amont de l'exon 1a (Figure 1.12). Parmi ces éléments, on compte deux boîtes GC, un motif de liaison pour le récepteur nucléaire de type NR5A qui semble non fonctionnel, mais surtout la présence d'un motif E-box qui s'est révélé critique pour l'activité du promoteur dans les lignées cellulaires gonadiques.

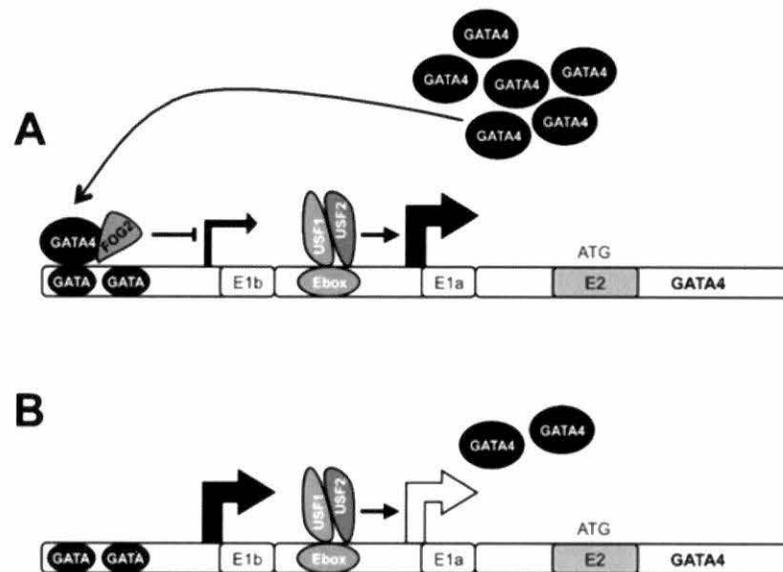


Figure 1.13 Mécanisme proposé pour la régulation de la transcription du gène *Gata4*

A- La liaison de certains facteurs dont les protéines ubiquitaires USF au motif crucial Ebox du promoteur 1a de *Gata4* génère des transcrits E1a qui sont efficacement traduits pour la production d'une protéine GATA4 normale et fonctionnelle. GATA4 autorégule négativement la transcription du transcrit E1b en se liant à ses sites localisés au niveau du promoteur 1b et en interagissant avec son partenaire FOG2. B- Lorsque les niveaux de GATA4 sont faibles à cause d'une baisse de transcription au niveau du promoteur 1a, l'inhibition par rétrocontrôle négatif exercée par le complexe GATA4/FOG2 sur le promoteur 1b est levée permettant la transcription et la traduction des transcrits E1b qui assurent des niveaux adéquats de GATA4 (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014).

Des essais EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) ont permis de mettre en évidence les interactions du motif E-box avec les facteurs de transcription de la famille USF, avec un rôle plus marqué pour le facteur USF2 dans la régulation de l'activité du promoteur de *Gata4* (Mazaud Guittot *et al.*, 2007). Le motif E-box est connu comme site de liaison pour une variété de facteurs de transcription. Son interaction avec d'autres facteurs autre que les membres de la famille USF n'est donc pas exclue. Ceci renforce l'intérêt d'analyser l'effet d'une mutation du motif E-box sur l'expression de *Gata4* chez la souris.

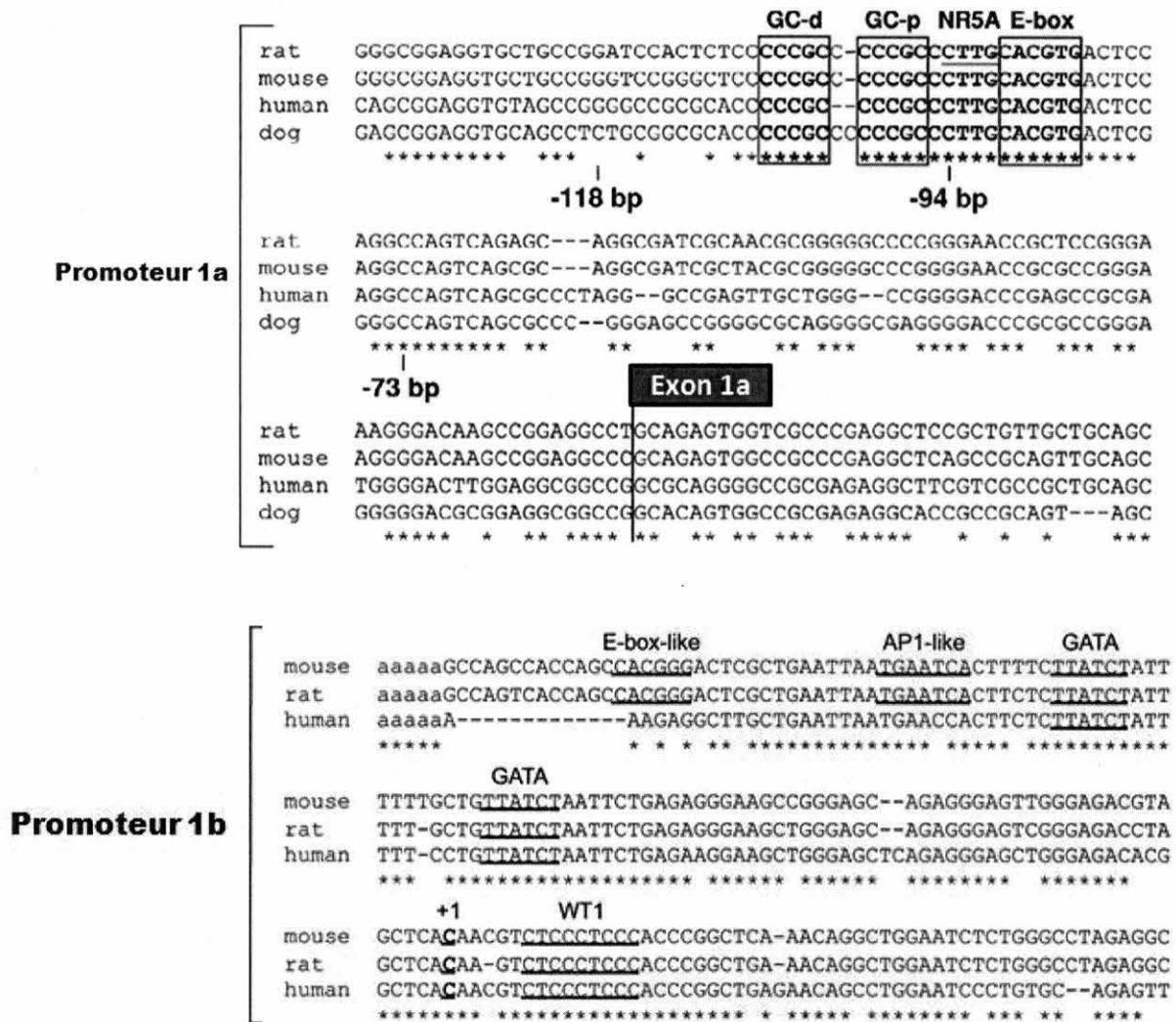


Figure 1.14 Alignement des séquences des promoteurs proximal et distal de *Gata4* chez différentes espèces

Le promoteur proximal 1a contient 2 motifs GC (GC-d et GC-p), un site NR5A (récepteur nucléaire de la famille NR5A), un motif E-box et un site GATA non présent sur la séquence. Le promoteur distal 1b contient surtout 2 sites de liaison de facteurs GATA. Tous ces motifs sont conservés à travers divers espèces de rongeurs et chez l'humain. Ce qui leur confère certainement une importance dans l'expression du gène *GATA4*. Tiré de (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014; Mazaud Guittot *et al.*, 2007).

7.3 Les protéines USF

Les protéines USF-1 et -2 appartiennent à la superfamille de facteurs de transcription de type bHLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) conservés au cours de l'évolution. Ce sont des protéines ubiquitaires qui se lient avec une haute affinité aux motifs consensus de type CANNTG. Les protéines bHLH-LZ se caractérisent par la présence d'une région basique formant le domaine de liaison à l'ADN au niveau du motif E-box et de deux domaines de dimérisation (HLH et LZ). Les facteurs USF participent à la régulation de l'expression des gènes de différentes manières: ils activent la chromatine en facilitant le recrutement des facteurs de remodelage et interagissent avec les composés du complexe de pré-initiation de la transcription. Leurs fonctions sont assez variées. Ils sont impliqués dans la réponse immunitaire, la réponse au stress, la régulation du cycle et le contrôle de la prolifération cellulaire, le métabolisme des lipides et des glucides ainsi que dans la régulation de gènes suppresseurs de tumeur (Corre et Galibert, 2006).

VIII-RÉGULATION POST-TRADUCTIONNELLE DE LA PROTÉINE GATA4

En plus des interactions protéine-protéine, la fonction de nombreux facteurs de transcription est modulée par des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, l'ubiquitination, la SUMOylation et la phosphorylation (Perdomo *et al.*, 2012; Viger *et al.*, 2008). GATA4 est soumis à ces modifications post-traductionnelles qui influencent sa liaison à l'ADN, interfèrent avec son activité transcriptionnelle et affectent sa localisation nucléaire (Pikkarainen *et al.*, 2004; Suzuki, 2011).

8.1 Acétylation

L'acétylation des protéines consiste en l'ajout d'un groupement acétyle ($\text{CH}_3\text{-C=O}$) sur les résidus lysine. Par exemple, l'acétylation des histones par les histone-acétyltransférases (HAT) est un processus de régulation de l'expression génique bien caractérisé. Les HATs activent la transcription en facilitant l'ouverture de la chromatine par l'acétylation des résidus lysine situés dans les portions N-terminales des nucléosomes des histones (Chan et La Thangue, 2001). Le complexe protéique CPB/p300 pourvu d'une activité HAT, en plus d'acétyler les histones, est capable d'acétyler d'autres régulateurs transcriptionnels (Chan et La Thangue, 2001; Hayakawa *et al.*, 2004). C'est le cas de GATA4 qui est acétylé par l'histone acetyl transferase p300 sur ses résidus lysine 311, 318, 320, et 322 avec pour corollaire un renforcement de sa liaison à l'ADN et de son activité transcriptionnelle (Takaya *et al.*, 2008). Dans le même sens, la surexpression de p300 dans le cœur chez des souris transgéniques induit une acétylation de Gata4 accompagnée par une hypertrophie cardiaque (Miyamoto, S. *et al.*, 2006; Yanazume *et al.*, 2003). p300 est également impliqué dans l'acétylation et la liaison de GATA4 à l'ADN durant la différenciation des cellules souches embryonnaires en cardiomyocytes comme l'ont rapporté Kawamura *et al.* (Kawamura *et al.*, 2005). Le traitement de cardiomyocytes embryonnaires de rats par la curcumine, un inhibiteur de HAT a démontré que l'acétylation des histones médiée par p300 joue un rôle essentiel dans la régulation des gènes cardiaques incluant GATA4 (Zheng *et al.*, 2013). Enfin tout

récemment, des études effectuées dans des cardiomyocytes de rat ont démontré que la stimulation induite par l'érythropoïétine (EPO) active la voie ERK/MAPK qui entraîne la phosphorylation de GATA4 tout en renforçant son acétylation et sa stabilité via la serine 261 (Jun *et al.*, 2013). Signalons toutefois que très peu d'études se sont focalisées sur l'impact de l'acétylation de GATA4 au niveau gonadique.

8.2 Ubiquitination

L'ubiquitination a été reconnue pendant longtemps pour sa fonction dans le marquage des protéines devant subir une dégradation au niveau du protéasome mais son rôle est désormais bien établi dans la transcription, la signalisation, la régulation du cycle cellulaire et le système immunitaire incluant la présentation de l'antigène (Ciechanover et Iwai, 2004; Varshavsky, 2005). L'attachement réversible de molécules d'ubiquitine aux protéines ciblées est régulé par l'action successive de trois classes différentes de protéines. Ces protéines sont constituées d'une enzyme activant l'ubiquitine (E1) qui contient un résidu cystéine actif sur lequel se fixe la glycine de l'extrémité carboxy-terminale de l'ubiquitine par une liaison thioester, d'une enzyme conjuguée à l'ubiquitine (E2) vers laquelle l'ubiquitine est transférée et d'une ubiquitine ligase (E3) qui catalyse l'attachement de l'ubiquitine à une lysine dans la protéine cible (Ciechanover *et al.*, 1982; Hershko *et al.*, 1983). La protéine d'ubiquitine elle-même est une protéine complexe constituée de 76 acides aminés dont 7 résidus lysine qui peuvent servir de point d'ancrage pour la fixation d'autres molécules d'ubiquitine menant à la formation de polymères (poly-ubiquitination) (Ciechanover et Ben-Saadon, 2004; Weissman, 2001). Certaines protéines sont ainsi ubiquitinées avec une seule molécule sur un seul résidu lysine (mono-ubiquitination) ou sur plusieurs résidus lysine (multi-mono-ubiquitination) (Komander, 2009). Il a été démontré que la multi-mono-ubiquitination des récepteurs de surface cellulaire déclenche leur internalisation ainsi que leur dégradation subséquente dans les lysosomes ou leur recyclage à la surface cellulaire (Haglund *et al.*, 2003). Le résultat fonctionnel de la polyubiquitination dépend quant à lui du résidu lysine qui est utilisé pour l'allongement de chaîne (Emmerich *et al.*, 2011). Par exemple, la poly-ubiquitination

sur les résidus lysine-48 et -29 de l'ubiquitine peut agir comme un signal menant à la dégradation de la protéine ciblée par la voie du protéasome alors que l'ubiquitination sur les autres résidus lysine tel que la lysine-63 peut mener à la réparation de l'ADN ou à l'activation des facteurs de transcription (Weissman, 2001).

En dépit du fait que l'ubiquitination soit impliquée dans la régulation des activités biologiques de diverses protéines, les mécanismes moléculaires de ce processus post-traductionnel critique demeurent très peu connus pour les facteurs GATA. Un article paru très récemment a mis en évidence que l'érythropoïétine augmente de façon significative la phosphorylation de GATA4 via la serine 105 en activant la voie de signalisation ERK, réduisant ainsi l'ubiquitination de GATA4 induite suite à l'hypoxie avec pour effet immédiat une augmentation de la stabilité de la protéine (Jun *et al.*, 2013) associée à une augmentation de la survie cellulaire dans les cardiomyocytes de rats.

8.3 Sumoylation

La sumoylation consiste à l'attachement réversible par des ligases spécifiques d'un groupement SUMO (small ubiquitin-like modifier) à un résidu lysine d'une séquence térapeptidique Ψ KXE (où Ψ représente un résidu hydrophobe, K, la lysine qui sera sumoylée, X, n'importe quel acide aminé et E, un résidu glutamate) (Seeler et Dejean, 2003). La voie desumoylation se compose d'une enzyme d'activation E1 (l'hétérodimère SAE1/SAE2), d'une enzyme de conjugaison E2 (Ubc9) qui transfère la molécule SUMO au résiducible (Melchior, 2000) et d'une SUMO E3 ligase qui promouvoit le transfert du groupement SUMO de l'enzyme E2 sur des substrats spécifiques. Trois protéines (RanBP2, les protéines PIAS et polycombe Pc2) identifiées ont montré une activité SUMO E3 ligase malgré leurs localisations subcellulaires distinctes (Kagey *et al.*, 2003; Pichler et Melchior, 2002). Quatre membres de SUMO ont été identifiés chez les vertébrés supérieurs. Parmi eux, SUMO-1 est 50 % identique aux SUMO-2 et 3 qui sont très similaires. Le processus de sumoylation modifie l'activité fonctionnelle de la cible en régulant les interactions protéine-protéine (Matunis *et al.*, 1998), le transport nucléocytoplasmique (Lin *et al.*, 2003; Pichler et Melchior, 2002), les interactions

protéine-ADN (Hong *et al.*, 2001) et/ou la stabilité de la protéine (Desterro *et al.*, 1998; Steffan *et al.*, 2004). Un grand nombre de protéines ont été révélés être les cibles de sumoylation (Chauchereau *et al.*, 2003; Komatsu *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2004), soulignant la possibilité que les sumoylations jouent des rôles importants et étendus dans la modulation de nombreux processus cellulaires via la modification de protéines cibles.

Il a été rapporté que GATA2 est un substrat pour SUMO1/2 et que la E3 ligase PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT1) supprime la capacité d'activation de GATA2 sans affecter significativement sa capacité de liaison à l'ADN (Chun *et al.*, 2003). Il a été récemment démontré que GATA1 est sumoylée par SUMO-1 et que PIAS1 réprime spécifiquement l'activation des promoteurs GATA-dépendant (Collavin *et al.*, 2004). On peut donc par extrapolation suggérer que la sumoylation est un important mécanisme qui pourrait être impliquée dans la modulation de l'activité fonctionnelle des autres membres de la famille GATA. Ainsi, des études ont permis de constater que GATA4 est en effet modifiée par SUMO-1, à la fois *in vivo* et *in vitro*, avec la ligase E3 PIAS1 améliorant fortement l'efficacité de la sumoylation. Contrairement à l'effet répressif de la sumoylation sur l'activation de GATA1 et GATA2, la sumoylation de GATA4 s'est traduite par une meilleure activation transcriptionnelle et a fortement induit l'activité transcriptionnelle endogène des gènes cardiaques spécifiques dans des cellules de fibroblastes pluripotentes (Wang *et al.*, 2004). Dernièrement, des études réalisées à partir des cellules épithéliales intestinales ont révélé que la ligase E3 PIAS1 médie la sumoylation de GATA4 par SUMO-1 sur son résidu lysine 366 et que cette sumoylation n'affecte ni la localisation nucléaire de GATA4 ni sa stabilité (Belaguli *et al.*, 2012). L'interaction de GATA4 avec son partenaire FOG2 est fortement influencée par le statut de sumoylation de FOG2. En effet, la présence de GATA4 semble favoriser la sumoylation de FOG2. Il est rapporté qu'une augmentation de la sumoylation de FOG2 promouvoit l'activité transcriptionnelle de GATA4 en régulant à la hausse son activation tandis que la répression exercée par FOG2 est diminuée. En absence de sumoylation, le

phénomène inverse est observé, la répression transcriptionnelle de FOG2 sur GATA4 est renforcée (Perdomo *et al.*, 2012).

8.4 Phosphorylation

La phosphorylation compte parmi les mécanismes de régulation les plus fréquents chez les protéines. C'est un processus réversible catalysé par des kinases (phosphorylation) et des phosphatases (déphosphorylation) qui consiste à l'ajout des groupements phosphates (PO_4) sur les résidus sérines, thréonines et tyrosines. L'activation des kinases résulte généralement de la réception de signaux extracellulaires (facteurs de croissances, hormones etc...) qui sont transduits à l'intérieur des cellules cibles qui génèrent une réponse appropriée. La phosphorylation des protéines GATA produit des effets très variables et même parfois opposés dépendamment de la kinase impliquée et surtout du site ou de l'acide aminé ciblé. Ainsi, la phosphorylation MAPK-dépendante de GATA1 entraîne son ubiquitination et sa dégradation (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2006). Dans ce même optique, il a été rapporté que la phosphorylation de GATA2 par la kinase Akt diminue son affinité pour l'ADN et provoque son retrait du noyau (Menghini *et al.*, 2005). À contrario, la phosphorylation de GATA2 par une kinase différente, de type Cdk (cyclin dépendant kinase) entraîne sa dégradation par la voie du protéasome (Koga *et al.*, 2007). La phosphorylation apparaît donc comme un mécanisme limitant pour l'activation de GATA1 et GATA2 alors qu'elle régule positivement l'activité de GATA3 et GATA4. GATA3 justement est transloquée au noyau suivant sa phosphorylation par la p38 MAPK (Maneechotesuwan *et al.*, 2007).

Concernant GATA4, deux sites de phosphorylation ont été identifiés sur les résidus sérine en position 105 et 261 de la protéine (Figure 1.13). En effet, en réponse à certains signaux hormonaux ou facteurs de croissance, l'activation de PKA via l'AMPc ainsi que les voies de signalisation MAPK conduisent à la phosphorylation de GATA4 sur ces résidus sérine spécifiques. Des travaux *in vitro* réalisés dans différentes lignées cellulaires gonadiques, ont confirmé que GATA4 est directement phosphorylé par PKA au niveau du résidu sérine 261 et que cette phosphorylation est critique pour l'activité maximale de la protéine

(Tremblay et Viger, 2003b). Par ailleurs, la phosphorylation de la sérine 105 via la voie des MAPK/ERK kinases qui se produit préférentiellement dans les cardiomyocytes (Charron *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2001) s'est révélé tout aussi importante *in vivo* puisque la réponse hypertrophique du cœur consécutive à une stimulation (stress) est compromise chez les souris portant une mutation *Gata4-S105A* (van Berlo *et al.*, 2011). La phosphorylation de GATA4 est un catalyseur puissant de son activité puisqu'elle augmente sa liaison à l'ADN ainsi que ses propriétés de transactivation au niveau des promoteurs de certains gènes cibles (Tremblay et Viger, 2003b). La phosphorylation de GATA4 renforce également sa capacité de recruter et d'interagir avec différents partenaires transcriptionnels (Wang *et al.*, 2004).

Bien que la phosphorylation des résidus S105 et 261 apparaisse critique pour l'activité de GATA4, l'importance de la phosphorylation de la sérine 105 dans la fonction de GATA4 dans les gonades n'a cependant pas été explorée et il n'existe pas encore de modèle murin permettant de vérifier l'importance de la phosphorylation de la sérine 261 *in vivo* dans la fonction de GATA4.

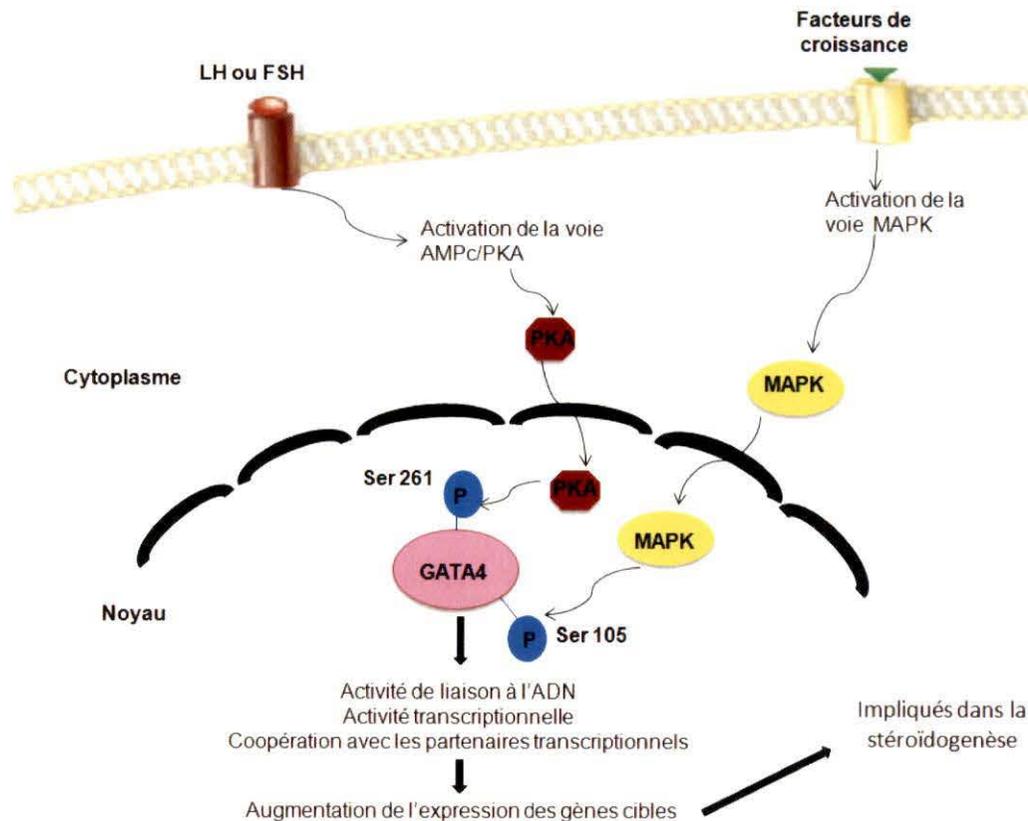


Figure 1.15 Mécanismes de signalisation intracellulaire dans la régulation de l'activité de GATA4 dans les cellules gonadiques

En réponse aux signaux hormonaux et/ou des facteurs de croissance, l'activation des voies de signalisation de l'AMPc/PKA et MAPK conduit à la phosphorylation de GATA4 sur les résidus sérines spécifiques: Sérine 261 et 105, cible respective de PKA et de la voie MAPK. La phosphorylation de GATA4 augmente sa liaison à l'ADN et ses propriétés de transactivation sur différents promoteurs gonadiques et renforce la capacité de GATA4 à recruter et coopérer avec différents partenaires transcriptionnels tels que SF1 (NR5A1), l'homologue 1 du récepteur hépatique (LRH-1/NR5A2), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP β) et CBP (cAMP response element-binding protein). Dans les cellules de la granulosa des souris et de rat, la signalisation déclenchée par les gonadotrophines ou les membres de la famille du TGF augmente la transcription de *Gata4*. Le TGF médie l'activation de Smad3 et sa coopération avec GATA4 conduit aussi à une transcription robuste des gènes gonadiques tels que *Inha* (Inhibine α). Adapté de Viger *et al.* (2008).

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET

La régulation de l'expression des gènes au sein de la famille *Gata* apparaît très complexe. En ce qui concerne *Gata4*, même si l'identification de différents éléments régulateurs, au sein des séquences introniques notamment, a amélioré la compréhension des mécanismes de régulation de son expression, aucune étude basée sur les éléments de son promoteur proximal 1a n'a été rapportée. Dans cette optique, notre équipe a justement identifié un motif E-box (**CACGTG**), localisé en amont de l'exon 1a et qui est important pour l'expression du transcrite correspondant dans une variété de lignées cellulaires gonadiques (cellules de Sertoli, cellules de Leydig et de la granulosa) (Mazaud Guittot *et al.*, 2007). Nous proposons que le motif E-box est un médiateur important de l'expression de *Gata4 in vivo* et qu'il contrôle spécifiquement l'expression du transcrite 1a. Nos objectifs pour ce projet de recherche ont donc été:

1- De générer une souris innovatrice *Gata4^{EboxKO}* dont les allèles expriment une mutation de l'élément E-box afin d'étudier sa contribution *in vivo*. Notre prédiction est que la mutation de ce motif conservé à travers différentes espèces affecte l'expression du transcrite 1a avec un effet possible sur l'expression de la protéine dans les tissus qui expriment GATA4, notamment les gonades.

2- D'identifier les facteurs liant le motif E-box *in vivo* afin de mieux comprendre la régulation de *Gata4* à travers cet élément régulateur au cours du développement. Les facteurs qui interagissent avec le dit motif sont ils toujours les mêmes ou varient-ils selon le sexe et/ou avec les différents stades de développement (embryonnaire, pré-pubère et adulte)?

3- De générer et de caractériser deux lignées de souris *Gata4^{S105A}* et *Gata4^{S261A}* portant une mutation de chacun des résidus sérine 105 et 261 afin d'évaluer leur importance dans la fonction de la protéine GATA4 *in vivo*.

En effet, il est connu que l'activité de GATA4, à l'instar d'autres protéines, est modulée par des modifications post-traductionnelles notamment les phosphorylations qui induisent soit des changements dans la localisation nucléaire, soit la liaison à l'ADN ou la

stabilité de la protéine. Il a été démontré que GATA4 est préférentiellement phosphorylée par PKA sur le résidu sérine 261 en réponse à une stimulation de lignées cellulaires gonadiques via la voie de l'AMPc. Cela a pour effet une augmentation de la capacité de transactivation de GATA4 sur différents promoteurs de gènes cibles tels que l'inhibine α ou *Star*, impliqués dans la stéroïdogénèse et renforce également l'interaction de GATA4 avec le co-activateur CBP (CREB-binding protein) (Tremblay et Viger, 2003b).

D'autre part, la sérine 105 de GATA4 est phosphorylée via la voie p38 et ERK1/2 MAPK dans les cellules cardiaques avec pour incidence l'augmentation de la liaison à l'ADN et l'activation de la transcription (Charron *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2001). La présence de ces deux sites phosphoaccepteurs distincts répondant à des signaux variés pourrait constituer un mécanisme régulateur important de la fonction de GATA4. Cependant, le rôle de la phosphorylation de ces deux résidus sérines dans la fonction gonadique de GATA4 n'a pas encore été rapporté *in vivo*.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Génération des modèles animaux d'étude

2.1.1 Ciblage génétique et génération des lignées *Gata4*^{EboxKO-Neo} et *Gata4*^{EboxKO}

Dans le but de déterminer l'importance du motif E-box dans la régulation de l'expression de *Gata4*, nous avons généré une lignée de souris *Gata4*^{EboxKO} portant une mutation de ce motif. Notre stratégie a consisté à générer un vecteur de ciblage (figure 2.1) pour permettre le remplacement de l'élément Ebox consensus (CACGTG) du gène *Gata4* endogène. Un site de restriction *Hind*III (AAGCTT) et une cassette PGKp-néomycine flanquée par des sites loxP (Neo Floxé) ont été insérés dans une délétion de 80 pb dans l'intron 1a-2 (figure 2.1). Les séquences des bras de recombinaison homologues 5' (3,2 kb) et 3' (3.0 kb) ont été obtenus par amplification par PCR de l'ADN génomique de souris FVB/n en utilisant le mélange de polymérase ADN Advantage II (Clontech). Ces produits de PCR ont été clonés dans le plasmide pGEM-T (Promega, Madison, WI) et leurs séquences ont été confirmées par séquençage. L'élément Ebox contenu dans le bras de recombinaison 5' a été ensuite converti en un site *Hind*III par mutagenèse dirigée à l'aide du kit Quick Change (Stratagene) selon les instructions du fabricant. Les bras de recombinaison ont ensuite été sous-clonés dans un vecteur de ciblage de chaque côté d'une cassette de sélection Neo flanqué de sites loxP. La mutation a été introduite dans le locus *Gata4* endogène par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (ES) transfectées par notre vecteur de ciblage. La cassette Neo confère une résistance à l'antibiotique G418 (généticine) et a permis la sélection de cellules souches embryonnaires ayant subi la recombinaison homologue après un traitement de ces cellules par un milieu contenant du G418. Le retrait subséquent de la cassette Neo si nécessaire peut être réalisé par une recombinase Cre grâce aux sites loxP.

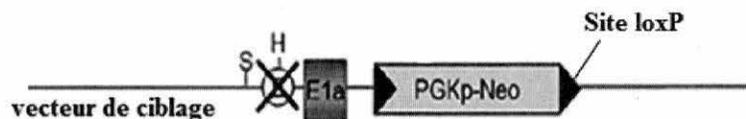


Figure 2.1 Schéma montrant le vecteur de ciblage pour introduire la mutation Ebox

Le vecteur ciblé montre en amont de l'exon E1a de *Gata4* le motif Ebox muté et remplacé par le site H, *Hind*III. Sont également visibles, la cassette de sélection Neo sous le contrôle du promoteur PGKp avec les deux sites loxP de chaque côté.

Les cellules souches embryonnaires (ES) R1 (issues de souris brunes, de fond génétique Sv129) ont été préalablement cultivées sur des cellules nourricières (MEFs) dans des conditions normales comme précédemment décrit (Pilon *et al.*, 2007; Pilon *et al.*, 2008). Les cellules ont été ensuite soumises à une électroporation (Gene Pulser Xcell™, BIO-RAD) avec 25 µg du vecteur de ciblage linéarisé puis sélectionnées avec la G418 (225 µg/ml) pendant 7 jours. Les clones survivants ont été isolés et l'évènement de recombinaison a été vérifiée par Southern blot. La micro-injection de cellules souches embryonnaires ciblées (portant la mutation du motif Ebox) dans des blastocystes et la production de souris chimériques ont été effectuées conformément aux procédures standards (Nagy *et al.*, 2003) par le service de micro-injection de l'IRCM (Institut de recherches cliniques de Montréal). Les cellules souches embryonnaires contribuent au développement de tous les tissus de la souris y compris les cellules germinales.

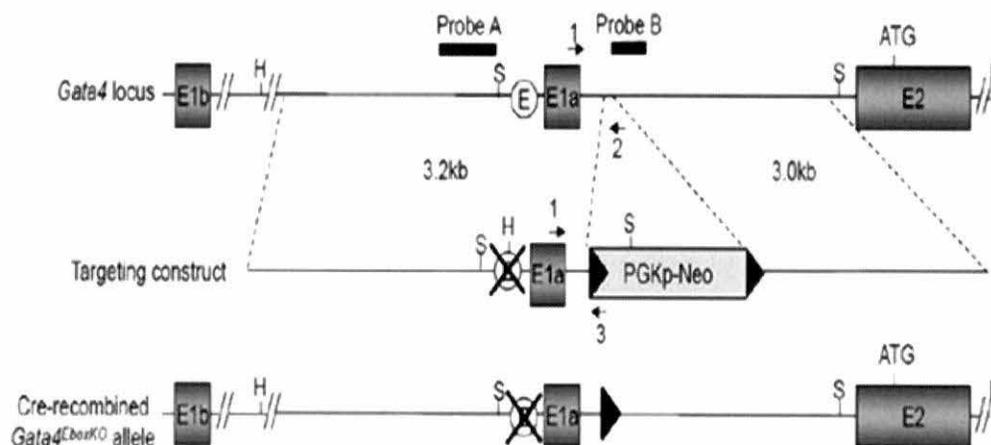


Figure 2.2 Ciblage du motif Ebox en amont de l'exon 1a du promoteur *Gata4* chez la souris Représentation schématique du locus *Gata4*, du vecteur de ciblage et de l'allèle recombiné final *Gata4*^{EboxKO}. La stratégie de ciblage a été conçue pour permettre le remplacement du motif Ebox de *Gata4* (cercle blanc) par un site de restriction *HindIII*. Une cassette de sélection néomycine flanquée par des sites loxP (triangles noirs) a également été incluse pour permettre la sélection par la généticine dans les cellules souches embryonnaires. Les flèches noires indiquent les oligonucléotides utilisés comme amorces et les barres noires indiquent l'emplacement des sondes utilisées pour l'analyse Southern blot. H, *HindIII* ; S, Sacl. Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

Les souris chimériques possèdent un mélange de couleur (brune et noire) puisqu'elles sont dérivées de cellules souches embryonnaires (issues du blastocyste receveur C57BL6 ainsi que de cellules souches embryonnaires injectées issues d'une souris brune). Les chimères nous ont été fournies après l'âge de sévrage (après 21 jours post-natal).

Par croisement de souris chimères avec des souris de type sauvage, nous avons obtenu des souris *Gata4*^{EboxKO-Neo} hétérozygotes. La stratégie de ciblage générait en effet au départ des souris avec la cassette Neo. Afin de retirer cette cassette, nous avons croisé les souris *Gata4*^{EboxKO-Neo} hétérozygotes avec des souris Meox2-Cre (généreusement fournies par le Dr Annik Prat, IRCM) qui expriment la recombinaise Cre de façon ubiquitaire. Le retrait de la cassette a été vérifié par PCR. Les souris hétérozygotes *Gata4*^{EboxKO} sans cassette Neo ont été croisées entre-elles afin d'obtenir des souris

Gata4^{EboxKO} homozygotes. Tel que montré dans la figure 2.2, l'allèle de type sauvage a été identifié en utilisant les amorces 1 et 2 (234 pb) alors que l'allèle ciblé a été identifié en utilisant les amorces 1 et 3 (169 pb). Les lignées *Gata4*^{EboxKO-Neo} et *Gata4*^{EboxKO} ont été maintenues dans un fond génétique mixte Sv129-C57BL/6 et leur génotypage a été réalisé par PCR à l'aide des oligonucléotides ci-dessous :

- 1- *Gata4*-sens: 5'-GGAAACTGGAGCTGGCCAGGTAG-3'
- 2- *Gata4*-antisens: 5'-CACCCATCAGTTTTTGCTGCTAATC-3'
- 3- LoxP-antisens: 5'-TATACTAGAGCGGCCGGATCCAATC-3'.

Pour générer les embryons pour les études sur les tissus foetaux, des couples de souris de type sauvage, *Gata4*^{EboxKO-Neo} et *Gata4*^{EboxKO} ont été mis en accouplement pendant toute la nuit. Midi du jour où un bouchon vaginal était observé a été désigné comme le jour E 0,5.

2.1.2 Génération de la lignée *Gata4*^{S261A}

Pour étudier l'importance de la phosphorylation de la sérine 261 dans la fonction de GATA4 dans les gonades, nous avons dans un premier temps généré un vecteur plasmidique afin de permettre de remplacer la production de la protéine GATA4 endogène par la protéine mutante GATA4^{S261A} via la recombinaison homologue dans les cellules ES. Le fragment contenant la sérine 261 de GATA4 auquel nous avons rajouté les séquences codantes pour l'épitope FLAG en 5', a été amplifié par PCR à partir d'un vecteur de la collection du labo (pRV89). La sérine en position 261 (TCC) a été mutée en alanine (GCC), afin de prévenir la phosphorylation sur ce site, en utilisant l'oligo *Gata4S261mut* (5'-CAGCGCCGCCTGGCCGCTTCCCGCCGG-3') selon les recommandations du kit Quick Change (Stratagene). La mutation a été confirmée par séquençage. L'ADNc de *Gata4S261A* a été sous-cloné dans le vecteur pIRES2-EGFP (Clontech) afin de permettre la co-expression de GFP. Le fragment FLAG-*Gata4S261A*-IRES-GFP a ensuite été sous-cloné dans un vecteur de recombinaison (Pilon et al. 2008) permettant ainsi la délétion de l'exon 2 de *Gata4* (contenant l'ATG initiateur) afin de le

remplacer par le fragment FLAG-Gata4S261A-IRES-GFP. Le vecteur de ciblage final (pNP122) qui contient aussi une cassette Neo en aval du fragment FLAG-Gata4S261A-IRES-GFP a été linéarisé et transfecté dans les cellules ES. Des clones résistants à la néomycine ont ensuite été repiqués et l'intégrité de leur génome a été vérifiée par Southern blot afin d'identifier des clones ayant subi l'évènement de recombinaison attendu. La production de souris chimères par micro-injection de cellules ES positives dans des blastocystes a de nouveau été réalisée par un service externe (IRCM). Les chimères (comme décrit plus haut) obtenues ont été croisées avec des souris de type sauvage dans le but d'obtenir des souris *Gata4*^{S261A} hétérozygotes viables et fertiles. Enfin, le croisement entre hétérozygotes devrait permettre l'obtention de souris *Gata4*^{S261A} homozygotes.

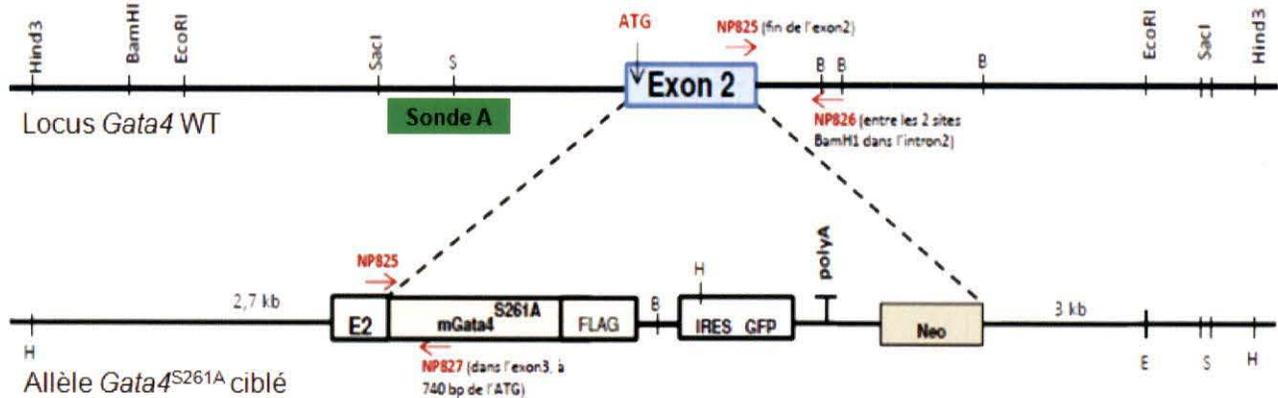


Figure 2.3 Ciblage de la sérine S261 de GATA4 chez la souris

Représentation schématique de la stratégie de ciblage génétique utilisée pour créer les souris *Gata4*^{S261A} mutées. La stratégie de ciblage vise à remplacer l'exon 2 de la protéine GATA4 endogène par la protéine mutante GATA4^{S261A} constituée par tout le cadre de lecture ouvert (ORF) de GATA4 incluant la sérine mutée flanquée d'une étiquette FLAG. Le gène ciblé contient également un IRES-eGFP qui va permettre la co-expression de GFP en présence de la protéine mutée ainsi qu'une cassette de sélection néomycine en aval pour permettre la sélection de clones avec la généticine. Les flèches rouges indiquent les oligonucléotides utilisés comme amorces et la barre verte indiquent l'emplacement de la sonde utilisée pour l'analyse Southern blot. H, *HindIII* ; E, *EcoRI*; B, *BamHI*; S, *SacI*.

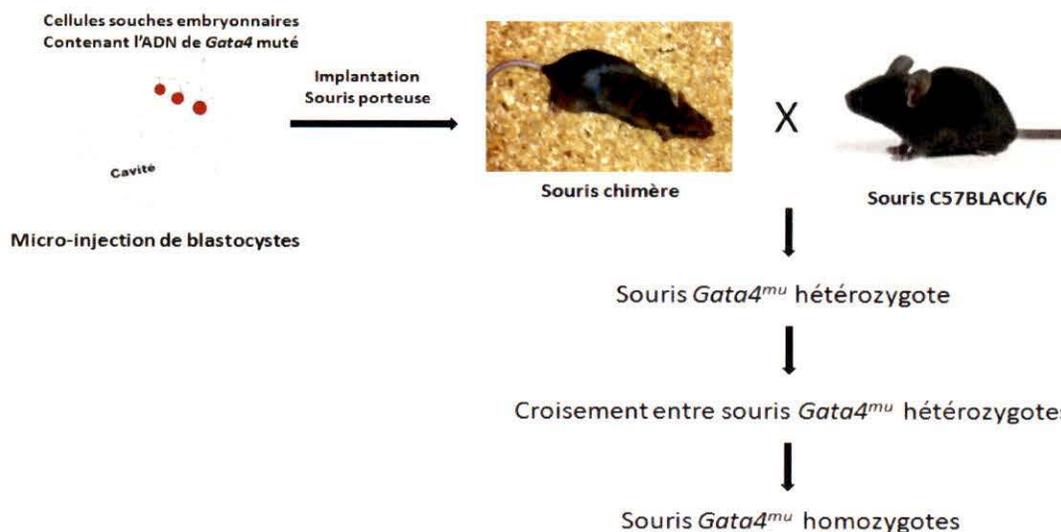


Figure 2.4 Stratégie globale récapitulant les différentes étapes d'obtention des lignées *Gata4* homozygotes caractérisées

mu : EboxKO-Neo, EboxKO ou S261A.

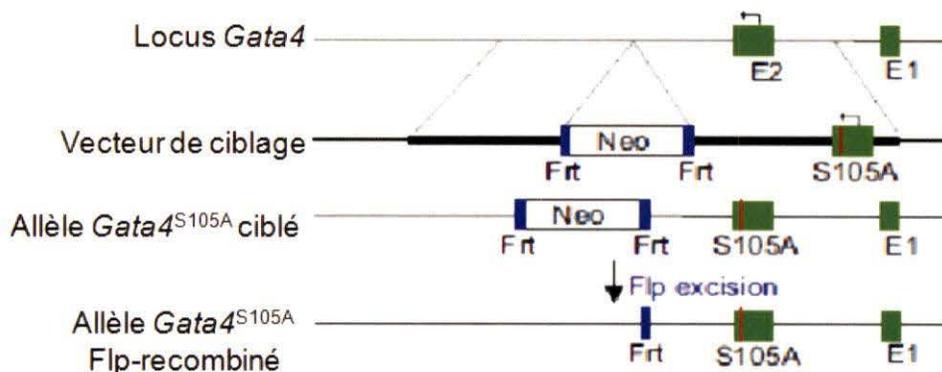


Figure 2.5 Stratégie de ciblage utilisée pour générer la lignée *Gata4*^{S105A}

Représentation schématique de la stratégie de ciblage génétique utilisée pour créer les souris *Gata4*^{S105A}. Le vecteur de ciblage généré par la technologie «Gene Bridges» a permis de remplacer le triplet codant pour la sérine 105 par celui d'une alanine dans le locus *Gata4* murin. Le gène ciblé contient également une cassette de sélection néomycine flanqué de sites Frt (Flippase recognition target). La stratégie de ciblage a donc consisté à remplacer l'exon 2 de la protéine *Gata4* endogène par la protéine mutante *Gata4*^{S105A} par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires. La cassette de sélection a ensuite été supprimée après croisement des souris hétérozygotes Neo avec des souris qui expriment la Flp-recombinase dans leur cellules germinales.

2.2 Cultures cellulaires

2.2.1 Protocole de préparation des MEFs

La génération des différentes lignées de souris *Gata4* a été faite par la technique du ciblage génétique mentionnée ci-dessus. Cette approche nécessitait l'utilisation de cellules MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) qui servent de cellules nourricières pour les cellules souches embryonnaires. Ces MEFs ont été préparées à partir d'une lignée de souris de la collection du laboratoire du Dr Pilon (souris *Cdx1*-nulle, UQAM), dont le génome contient une cassette de résistance à la néomycine. Brièvement, des embryons ont été extraits d'une femelle gestante entre les jours embryonnaires E12,5 et E14,5. La tête, le foie ainsi que les caillots de sang des embryons ont été délicatement retirés. Les restants des embryons ont été placés dans un pétris (5 embryons par pétris) de 6 cm et rincés avec 2 ml de PBS. Ils ont ensuite été découpés avec des ciseaux et incubés à 37°C sous agitation pendant 10 min dans 2 ml de trypsine. Après incubation, la suspension de tissu embryonnaire a été homogénéisée par aspiration et refoulement à l'aide d'une pipette puis incubée dans des flasques avec 5 ml de milieu (DMEM supplémenté avec 10% de FBS (fetal bovine serum) et pénicilline (50 U/ml)/streptomycine (50 mg/ml)) à 37°C + 5% CO₂. Ceci constitue le passage 1 (P1). Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont trypsinisées puis centrifugées. Le culot est resuspendu avec 6 ml de milieu de congélation (80% de milieu complet (DMEM + 10% FBS + Pen/strep) supplémenté de 10% de FBS et 10% de DMSO) et on les répartit dans des vials (1 ml/vial) qui sont conservés dans l'azote liquide. D'autres passages (P2, P3...) post-congélation ont été réalisés pour constituer le stock de cellule MEFs nécessaire et ont été conservés dans l'azote liquide.

2.2.2 Mise en culture des MEFs

Des cellules MEFs conservées dans l'azote liquide ont été dégelées au bain-marie puis mélangées avec du milieu pour MEFs afin de neutraliser le DMSO utilisé pour leur conservation. L'ensemble a été centrifugé à 1000 rpm pendant 2 min. Le culot de cellules

a été resuspendu et distribué dans 11 pétris de 10 cm qui ont été incubés à 37°C + 5% CO₂ jusqu'à confluence des cellules MEFs avant leur inactivation.

2.2.3 Inactivation des MEFs à la mitomycine

L'inactivation des MEFs avec la mitomycine C est une étape nécessaire pour empêcher la prolifération des cellules lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules souches embryonnaires. En effet, uniquement les cellules souches embryonnaires doivent être utilisées pour la génération des souris mutantes. Les MEFs sont donc traitées avec une solution finale de mitomycine C de 10 µg/ml puis incubées à 37°C + 5% CO₂. Après 2H, la mitomycine a été retirée des pétris et on a procédé à un triple rinçage des cellules avec du PBS. Les MEFs ont ensuite été traitées avec la trypsine 0,05% et incubées à 37°C + 5% CO₂. La trypsine a été neutralisée par ajout de milieu frais et les cellules ont été centrifugées à 1000 rpm pendant 2 min. Le culot cellulaire a été resuspendu avec du milieu de culture de cellules souches embryonnaires (DMEM supplémenté avec 15% de FBS premium, 1% d'acides aminés non essentiels (1X), pénicilline (50 U/ml)/streptomycine (50 mg/ml), 0.0007% de β-mercaptoéthanol et 0.3% de LIF pour empêcher la différenciation des cellules ES) et a été distribué sur des pétris de 6 cm gélatinisé (0,1%) pour la mise en culture des cellules souches embryonnaires. L'ensemble est incubé à 37°C + 5% CO₂.

2.2.4 Culture de cellules souches embryonnaires (ES)

Deux vials de cellules ES (R1) (généreusement fournies par le Dr Andras Nagy, Université de Toronto) ont été dégelés dans un bain-marie à 37°C. Après ajout de milieu, les cellules ont été centrifugées à 1000 rpm pendant 2 min. Après resuspension du culot, les cellules ont été transférées dans un pétris de 6 cm contenant déjà les cellules MEF inactivées. On rajoute 5 ml de milieu frais et on incube la pétris à 37°C + 5% CO₂. Lorsque les cellules ES sont confluentes, on réalise un passage (1:3 à 1:6) sur un pétris de 10 cm « - gélatinisé - » et avec MEFs. Les cellules sont ensuite gardées en incubation jusqu'à confluence avant l'étape d'électroporation.

2.2.5 Électroporation des cellules souches embryonnaires

Afin d'optimiser la transfection des cellules ES, le vecteur plasmidique contenant la mutation a été linéarisé par digestion avec une enzyme de restriction dont le profil de digestion est connu. L'ADN du fragment obtenu a ensuite été purifié par extraction au phénol-chloroforme (25: 24: 1: phénol, chloroforme, alcool isoamyl) et précipitation à l'éthanol. Le culot a été résuspendu dans de l'eau puis conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Pour l'électroporation proprement dite, une culture de cellules ES d'un pétri de 10 cm a été utilisée. Après trypsination, les cellules ES ont été résuspendues dans 0,8 ml de milieu puis transférées dans une cuvette d'électroporation de 0,4 cm (BioRad) contenant aussi 25 μg d'ADN plasmidique linéarisé. La cuvette a été placée dans un appareil (Gene Pulser XcellTM, BIO-RAD) et l'ADN a été électroporé dans les cellules suite à un choc électrique résultant d'un seul pulse (voltage: 250 mV, capacitance: 950 μF). Les cellules «électroporées» ont été distribuées dans 5 pétris de 10 cm gélatinisés et contenant des MEFs. Les 5 pétris ont ensuite été incubés à $37^{\circ}\text{C} + 5\% \text{CO}_2$.

2.2.6 Sélection des clones par résistance au G418

Suite à l'électroporation, les cellules ES ont été traitées durant 7 jours avec du milieu ES contenant de la généticine à 225 $\mu\text{g}/\text{ml}$ afin de sélectionner des clones transfectés avec le vecteur de ciblage. Les clones résistants au G418 ont été prélevés, dissociés à la trypsine puis individuellement transférés dans une plaque de 96 puits gélatinisée et contenant des cellules MEF inactivées. Une fois parvenues à confluence, les cellules ont été rincées avec du PBS puis dissociées suite à leur incubation avec de la trypsine 0.25%. 1/4 de cellules provenant de chaque puits est distribué dans 2 nouvelles plaques de 96 puits alors que les cellules ES restantes ont été réparties dans 4 plaques de 24 puits. Les cellules ES issues des 2 plaques de 96 puits ont été «trypsinisées», résuspendues dans le milieu de congélation, puis conservées à -80°C alors que les cellules ES des 4 plaques de 24 puits débarrassées du milieu ont été gardées à -20°C en vue d'une extraction d'ADN.

2.2.7 Préparation de l'ADN des cellules ES pour analyse de type Southern blot

Les 96 clones sélectionnés ont été digérés pendant la nuit à 65°C avec une solution de protéinase K (PK) (500 µg/ml). Une purification d'ADN des clones a ensuite été réalisée par extraction au phénol-chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol. L'ADN était prêt à utiliser pour les essais de type Southern blot.

2.2.8 Essais de type Southern blot

Pour vérifier l'efficacité de l'événement de recombinaison homologue, un essai de type Southern a été réalisé sur l'ADN de chacun des 96 clones sélectionnés. L'analyse a débuté par une digestion des clones dans une plaque de 96 puits, avec des enzymes de restriction choisies et dont on connaît le profil. Nous avons idéalement choisi des enzymes qui coupent 1 fois à l'intérieur et à l'extérieur de la région d'intérêt afin d'obtenir des fragments distincts entre les allèles muté et de type sauvage. L'ADN digéré des clones a ensuite été séparé sur un gel d'agarose 0,9%.

Après la migration, le gel a été incubé pendant 10 à 15 min dans une solution de TAE (Tris Acétate EDTA) (1X) + 0,02% de bromure d'éthidium avant d'être photographié. Le gel a été rincé dans de l'eau milliQ, puis dépuriné par incubation dans une solution 0,25M HCl pendant 20 min. L'ADN a ensuite été dénaturé suite à un double lavage du gel dans une solution de 0,5 M NaOH pendant 2 x 30 min. L'ADN des clones a été transféré par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement. Suite au transfert, la membrane a été rincée dans du SSC 6X (Saline-Sodium citrate) pendant 10-15 min puis pré-hybridée dans une solution d'hybridation (6X SSC, 5X Denhardt's, 0.5% SDS, tRNA 80 µg/ml) à 65° C pour 1-2H. Pendant ce temps, le fragment d'ADN servant de sonde a été dénaturé par chauffage pendant 10 min à 95° C, puis marqué au ³²P avec 50 µCi de [α ³²P] d-CTP à l'aide du kit rediprimeTM II (GE Healthcare). La sonde a été alors purifiée par passage sur une colonne Sephadex G-25. La membrane a été ensuite hybridée dans la solution d'hybridation contenant la sonde marquée au ³²P à 65°C pendant la nuit.

Après l'hybridation, la membrane a été rincée 3 fois dans une solution 2X SSC-0,1% SDS à raison de 15 min par lavage. La membrane a été scellée dans un morceau de pellicule transparente puis exposée dans une cassette Phosphorimager pendant 18 H. Le film a ensuite été développé dans un Phosphorimager BioRad. Lorsque des clones présentaient les résultats attendus selon le profil de restriction enzymatique préétabli, les cellules étaient récupérées à partir des plaques 96 puits conservés à -80°C, et remises en culture pour leur expansion avant leur envoi au service de micro-injection des blastocystes (IRCM).

2.2.9 Culture d'autres lignées cellulaires

La réalisation d'autres expériences dans cette thèse a nécessité la culture d'autres lignées cellulaires telles les cellules COS-7 (dérivées de fibroblastes de rein de singe transformés par l'antigène T de SV40) utilisées pour la préparation de témoin positif par surexpression, et les cellules MSC-1 (lignée cellulaire de cellules de Sertoli établie à partir de souris transgéniques portant un gène de fusion composé de séquences humaines du gène AMH liés au gène de l'antigène T de SV40) utilisées comme alternative aux extraits protéiques de gonades pour les essais de protéomique. Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant du glucose à 4,5 g/l, de la glutamine 2 mM (Wisent) complété de sérum de veau fœtal (10%) et auquel a été rajouté un mélange antibiotique pénicilline (50 U/ml)/streptomycine (50 mg/ml).

2.3 Collecte des tissus et analyses qPCR

Pour la lignée *Gata4*^{EboxKO}, les tissus exprimant GATA4 (gonades, cœur et foie) ont été recueillis à différents stades de développement (embryonnaire E15,5, pré-pubère P14 et adulte) afin d'évaluer l'expression des différents transcrits *Gata4* par PCR quantitative. L'ARN total a été isolé à partir des tissus de souris en utilisant le réactif trizol selon les directives du fabricant (Invitrogen, Burlington, Canada). Tous les tissus prélevés ont préalablement été pesés avant leur conservation à -20°C afin d'ajuster le volume de trizol à utiliser durant l'extraction d'ARN (1 ml pour 50-100 mg de tissu). La

concentration d'ARN a été dosée au spectrophotomètre avant son utilisation pour les expériences de qRT-PCR.

Les premiers brins d'ADNc ont été synthétisés à partir de 5 µg d'aliquot des différents ARNs en utilisant le système de la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen). Les qPCR en temps réel ont été réalisées en utilisant un instrument LightCycler 1.5 et la trousse LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics Canada, Laval, Canada). Les amorces utilisées pour la PCR quantitative sont présentées dans le tableau 2.1. Tous les essais qPCR ont été effectués dans les conditions suivantes : 10 min à 95°C suivie par 35 cycles de dénaturation (5 sec au 95°C), hybridation (5 sec à 60°C), et d'extension (20 sec à 72°C) avec une seule acquisition de niveaux de fluorescence à la fin de chaque étape d'extension. Chaque amplification a été réalisée en double exemplaire en utilisant au moins trois préparations différentes du premier brin d'ADNc préparé à partir de chaque organe. La spécificité des produits amplifiés par PCR a été confirmée par analyse de la courbe de fusion et par électrophorèse sur gel d'agarose. Les différences dans les niveaux d'ARNm entre les échantillons ont été quantifiées à l'aide de la méthode de la courbe standard. Des fragments d'ADN contenant les exons E1A et E1B du gène *Gata4* de la souris ont été amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur pGEM-T easy (Promega) afin de générer les standards E1a et E1b ayant servi à la préparation des courbes de dilution. Un fragment cloné du gène ribosomal *Rpl19* a servi de gène de référence. Des dilutions en série du gène ciblé et des plasmides de référence allant de 0,1 fg/ml à 0,1 ng/ml ont été préparées afin de générer des courbes standards. La quantité d'ADN du gène ciblé (E1a, E1b) et du gène de référence (*Rpl19*) dans les échantillons inconnus a été calculée par le logiciel LightCycler 3.5 (Roche Diagnostics Canada) en utilisant les courbes de dilution respectives. Les données sont présentées en unités arbitraires en tant que rapport entre le niveau de variation des transcrits E1a ou E1b de *Gata4* dans chaque échantillon à celui du gène de référence *Rpl19*. Pour chaque point d'analyse, des tissus provenant d'au moins trois animaux par génotype ont été utilisés.

Pour l'étude des souris *Gata4*^{S105A}, les testicules de souris adultes (3 mois) ont été recueillis pour évaluer l'expression de *Gata4* et de différents gènes cibles de GATA4 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Hsd17b3* et *Srd5a1*) par qPCR. L'ARN total a été isolé à partir de tissus en utilisant le réactif trizol comme décrit précédemment. Après dissection et retrait de la graisse qui enveloppait chaque tissu, le poids a été déterminé sur une balance analytique. Les essais de qPCR ont été réalisés avec les mêmes outils et suivant les mêmes paramètres énoncés plus haut. Chaque amplification a été réalisée en duplicata et pour des tissus provenant d'un minimum de trois animaux différents par génotype. Les amorces utilisées pour la qPCR sont répertoriés dans le tableau 2.2. Des fragments d'ADN contenant les séquences *Gata4* et les différents gènes cibles du facteur GATA4 ont été amplifiés par PCR sur de l'ADNc. Ces ADNc ont préalablement été synthétisés à partir d'ARN extrait de testicules de souris adultes et cloné dans le vecteur pGEM-T easy (Promega) pour la génération des standards ayant servi à la préparation des courbes de dilution. Une fois de plus, le fragment cloné du gène ribosomal *Rpl19* a servi de gène de référence.

Tableau 2.1 Oligonucléotides utilisés pour l'analyse des souris *Gata4*^{EboxKO}

Nom de l'oligo	Séquences
<i>Gata4</i> E1a sens	5'-TCCGCGGACTCACGGAGATC-3'
<i>Gata4</i> E1b sens	5'-ACAGGCTGGAATCTCTGGGCCT-3'
<i>Gata4</i> E2 antisens	5'-ACCAGAGCGGCTCCAGCGAA-3'
<i>Rpl19</i> sens	5'-CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG-3'
<i>Rpl19</i> antisens	5'-GGACAGAGTCTTGATGATCTC-3'

Tableau 2.2 Oligonucléotides utilisés pour l'analyse des souris *Gata4*^{S105A}

Cibles	Séquences
<i>Gata4</i>	F: 5'-TGGAATAGAGTCCGCCCTCC-3' R: 5'-GAACTAGAATGCGGGTGTGC-3'
<i>Star</i>	F: 5'-CAACTGGAAGCAACTCTA-3' R: 5'-CCTTGACATTTGGGTCCAC-3'
<i>Cyp11a1</i>	F: 5'-CACCAGTATTATCAGAGCCCC-3' R: 5'-GATGAAGTCCTGAGCTACACC-3'
<i>Hsd3b1</i>	F: 5'-AGCTGCCCCTGATCTTTTCAGCC-3' R: 5'-CGCATGCCTGCTTCGTGACCA-3'
<i>Hsd17b3</i>	F: 5'-CTCATCCACTGCAACATTAC-3' R: 5'-GAAGCTGAGTACAGGCTGTA-3'
<i>Srd5a1</i>	F: 5'-TGCTGGCTATGTTTCTGATCC-3' R: 5'-TCAAGTATCGGCTCTGCAAG-3'
<i>RpL19</i>	F: 5'-CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG-3' R: 5'-GGACAGAGTCTTGATGATCTC-3'

2.4. Préparation de coupes histologiques

Pour les analyses histologiques des souris, les gonades ont été récoltées aux différents stades de développement ciblés (E15,5, P14 et adulte), fixés pendant une nuit dans la formaline 10% et enrobés dans la paraffine. Les sections de paraffine (4 mm) ont été colorées avec l'hématoxyline et de l'éosine (H & E). Les images ont été prises avec une caméra Leica DFC 495 montée sur un microscope Leica DM 2000 (Leica Microsystems Canada, Richmond Hill, Canada).

2.5 Immuno-histochimie

2.5.1 Immuno-histochimie sur coupes histologiques

Les sections de gonade paraffinées ont été déparaffinées, réhydratées et traitées avec 10 mM d'acide citrique dans un four à micro-ondes pendant 10 à 20 min afin d'améliorer la pénétration de l'anticorps. L'activité de la peroxydase endogène a été bloquée avec 0,3 % de peroxyde d'hydrogène et la liaison non spécifique a été empêchée en incubant avec 0,1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 1h à température ambiante. Les coupes de gonade ont ensuite été incubées pendant une nuit à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage (PBS contenant 0,1% de BSA). Tous les témoins négatifs ne comportent pas d'anticorps primaires. Les lames ont été lavées le lendemain dans du PBS et incubées 1 heure avec un anticorps secondaire biotinylé et marqué à la Streptavidine-Peroxydase (Vector Laboratories, Burlington, Canada). Après lavage dans du PBS, les coupes ont été incubées en présence d'une solution d'avidine-biotine (ABC, Vectastain Kit Elite ABC, Vector Laboratories, Burlington, Canada) pendant 1 heure à température ambiante. L'activité peroxydase a été visualisée en utilisant une solution de 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC, Sigma- Aldrich Canada, Oakville, Canada), 50 mM de tampon acétate pH 5,2 (0,2 M d'acétate de sodium ; 0,2 M d'acide acétique) et 0,0005 % de H₂O₂. Les coupes ont ensuite été contre-colorées avec l'hématoxyline (Ricca Chemical Company, Arlington, TX) et traitées avec la solution de montage MOWIOL (Merck Millipore, Gibbstown, NJ). Les lames ont été analysées avec un microscope à épifluorescence Zeiss Akioskop II (Carl Zeiss Canada, Toronto, Canada) relié à un appareil photo numérique (Spot RT curseur ; instruments de diagnostic, Sterling Heights, MI). Les anticorps primaires et secondaires ainsi que les dilutions utilisées sont énumérées dans le tableau 2.3. Pour les analyses d'histologie et d'immuno-histochimie, pour chaque génotype, les tissus examinés provenaient de 3 animaux indépendants.

2.5.2 Immuno-histochimie sur embryons entiers

L'analyse de l'expression embryonnaire de GATA4 dans le modèle *Gata4*^{EboxKO-Neo} homozygotes, a nécessité l'utilisation de la technique d'immuno-histochimie sur embryons entiers. Pour ce faire, nous avons utilisé le protocole décrit précédemment par (Nagy et al., 2003). En bref, les embryons ont d'abord été recueillis dans du PBS et fixés dans du méthanol: DMSO (4:1) pendant une nuit à 4°C. Ils ont ensuite été blanchis dans le méthanol : DMSO : H2O2 (04:01:01) pendant 5 heures à température ambiante, réhydratés pendant 30 minutes avec du méthanol 50%, et finalement avec du PBS. Les embryons ont été incubés deux fois dans du PBSMT (2 % de lait écrémé en poudre instantané, 0,1% de Triton X-100 dans du PBS) pendant 1 heure à température ambiante, puis avec un anticorps primaire de chèvre GATA4 anti-souris (sc-1237X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) dilué dans du PBSMT (1:50) à 4°C pendant une nuit. Ils ont ensuite été lavés deux fois dans du PBSMT à 4°C et 3 fois à température ambiante pendant 1 heure chacun, suivi par une nuit d'incubation à 4°C avec un anticorps secondaire conjuguée de lapin IgG anti-chèvre couplé à la peroxydase (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) dilué dans PBSMT (1:500). Les embryons ont été lavées comme décrit ci-dessus avec un lavage final supplémentaire de 20 min dans du PBT (0,2 % de BSA, 0,1% de Triton X-100 dans PBS) à température ambiante. Pour la réaction de coloration, les embryons ont été pré-incubées avec 0,3 mg/ml de 3,30-diaminobenzidine tétrahydrochlorure (Sigma- Aldrich) dans du PBT pendant 30 min à température ambiante, suivi par l'addition de peroxyde d'hydrogène H2O2 à 0,0003 % et d'une incubation à température ambiante jusqu'à ce que se développe une coloration brune. Ils ont ensuite été rincés dans PBT pour arrêter la réaction, post-fixés une nuit dans du paraformaldéhyde 4% et éclaircis dans le glycérol: PBS (1:1). Les images ont été prises avec un appareil photo Leica DFC 495 monté sur un stéréomicroscope Leica M205 FA (Leica Microsystems Canada).

Tableau 2.3 Anticorps utilisés pour l'immuno-histochimie sur les gonades des souris homozygotes *Gata4*^{S105A}

Cible	Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
GATA4	Polyclonal de chèvre anti-souris GATA4 IgG (sc-1237x)	1: 250	De lapin biotinylé anti-chèvre (BA-5000)	1: 500
STAR	Polyclonal de lapin anti-humain STAR IgG (sc-25806)	1: 100	De chèvre biotinylé anti-lapin (BA-1000)	1: 500
CYP11A1	Polyclonal de chèvre anti-humain CYP11A1 IgG (sc-18043)	1: 100	De lapin biotinylé anti-chèvre (BA-5000)	1: 500
CYP17A1	Polyclonal de chèvre anti-souris CYP17A1 IgG (sc-46081)	1: 100	De lapin biotinylé anti-chèvre (BA-5000)	1: 500
3β-HSD	Polyclonal de chèvre anti-humain 3 β -HSD IgG (sc-30820)	1: 100	De lapin biotinylé anti-chèvre (BA-5000)	1: 500
17β-HSD3	Polyclonal de chèvre anti-humain 17 β -HSD3 IgG (sc-66415)	1: 50	De lapin biotinylé anti-chèvre (BA-5000)	1: 500
5α-reductase 1	Polyclonal de chèvre anti-mouse 5 α -reductase IgG (sc-20399)	1: 50	De lapin biotinylé anti-chèvre (BA-5000)	1: 500

Les embryons ont été incubés deux fois dans du PBSMT (2 % de lait écrémé en poudre instantané, 0,1% de Triton X-100 dans du PBS) pendant 1 heure à température ambiante, puis avec un anticorps primaire de chèvre GATA4 anti-souris (sc-1237X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) dilué dans du PBSMT (1:50) à 4°C pendant une nuit. Ils ont ensuite été lavés deux fois dans du PBSMT à 4°C et 3 fois à température ambiante pendant 1 heure chacun, suivi par une nuit d'incubation à 4°C avec un anticorps secondaire conjuguée de lapin IgG anti-chèvre couplé à la peroxydase (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) dilué dans PBSMT (1:500). Les embryons ont été lavées comme décrit ci-dessus avec un lavage final supplémentaire de 20 min dans du PBT (0,2 % de BSA, 0,1% de Triton X-100 dans PBS) à température ambiante. Pour la réaction de coloration, les embryons ont été pré-incubées avec 0,3 mg/ml de 3,30-diaminobenzidine tétrahydrochlorure (Sigma- Aldrich) dans du PBT pendant 30 min à température ambiante, suivi par l'addition de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0,0003 % et d'une incubation à température ambiante jusqu'à ce que se développe une coloration brune. Ils ont ensuite été rincés dans PBT pour arrêter la réaction, post-fixés une nuit dans du paraformaldéhyde 4% et éclaircis dans le glycérol: PBS (1:1). Les images ont été prises avec un appareil photo Leica DFC 495 monté sur un stéréomicroscope Leica M205 FA (Leica Microsystems Canada).

2.6 Extraction de protéines nucléaires pour essai de type western blot et de protéomique

Les protéines nucléaires des lignées cellulaires en culture ont été extraites par la technique décrite par Schreiber *et al.* (1989). Les cellules sont d'abord rincées avec du PBS, puis détachées de la surface du pétris dans du PBS/EDTA 0.5 mM après 15 min d'incubation sur glace. Les cellules sont ensuite culottées dans un microtube à l'aide d'une microcentrifugeuse de table à température ambiante pendant 30 secondes à 7000 RPM. Le culot de cellule est délicatement résuspendu avec un tampon hypotonique A contenant des inhibiteurs de protéases (Tris pH7,9 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1mM, PMSF 0.5 mM, aprotinine 10 µg/ml, pepstatine 1 µg/ml). Les cellules en solution sont ensuite placées en incubation sur glace pour 15 minutes et

sont légèrement agitées en tapant doucement les tubes à quelques reprises afin de permettre aux cellules de demeurer en suspension pendant l'incubation. Après l'incubation, du surfactant 10% Nonidet P40 est ajouté puis la suspension de cellules est vortexée vigoureusement pendant 10 à 15 secondes afin de briser la membrane plasmique des cellules. Après centrifugation dans une microcentrifugeuse de table à température ambiante pendant 30 secondes à 16 000 RPM, le surnageant, comprenant les débris membranaires et le contenu du cytoplasme des cellules, est délicatement retiré par aspiration en prenant soin de ne pas toucher au culot gélatineux qui contient les noyaux cellulaires. Le culot contenant les noyaux est ensuite repris dans un tampon hypertonique B contenant des inhibiteurs de protéases (Tris pH 7,9 20 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM, aprotinine 10 µg/ml, pepstatine 1 µg/ml), puis placé en agitation à 4°C pendant 1h. Après une dernière centrifugation, le surnageant comprenant les protéines nucléaires est récupéré dans un microtube propre. Quelques microlitres d'extraits nucléaires ont été utilisés pour le dosage spectroscopique des protéines par la méthode de Bradford, en utilisant le réactif Bradford Biotechnology grade (BioShop, Canada) et l'albumine bovine sérique comme standard.

2.6.1 Essais de type Western blot

De 10 à 20 µg de protéines nucléaires ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% dénaturant pendant 1h à 100V. Les protéines ont ensuite été électro-transférées du gel d'acrylamide vers une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) Immun-Blot™ (BIO-RAD) pendant toute la nuit à 4°C, en utilisant le montage pour transfert Criterion™ Blotter (Bio-Rad). La détection de la protéine d'intérêt sur la membrane a été effectuée à l'aide du réactif de chimioluminescence Clarity™ Western ECL substrate (BIO-RAD) après 3 min d'incubation à température pièce. Les anticorps utilisés pour la détection de protéines spécifiques sont indiqués dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 Anticorps utilisés pour les essais de type Western blot

Cibles	Anticorps primaires	Dilution	Anticorps secondaires	Dilution
GATA4 phosphoS105	Polyclonal de lapin anti-GATA4 (phospho-S105) (Ab5245)	1: X	De chèvre anti-lapin IgG-AP (Abcam)	1:10000
GATA4-flag	Monoclonal de lapin anti-flag IgG (SIG1-25)	1:1000	De chèvre anti-lapin IgG-HRP (sc-2768)	1:10000
GATA4-flag	Monoclonal de souris anti-flag M2 IgG1 (SIGF-1804)	1:1000	De chèvre anti-souris IgG-HRP (sc-5000)	1:10000

X : 1/100, 1/250, 1/500

2.6.2 Essais de protéomique

Dans le but d'isoler les protéines qui interagissent avec le motif Ebox du promoteur *Gata4* proximal 1a, nous avons utilisé une stratégie s'appuyant sur l'affinité biotine-streptavidine mise en évidence par Levros et al. (Levros *et al.*, 2010) ainsi que par Fürbass et al. (Fürbass *et al.*, 2010). Pour ce faire, nous avons utilisé des oligos biotinylés (décrits au tableau 2.5) comme un ADN appât correspondant à 30 paires de base couvrant la région E-box de type sauvage

(5'-biotineCCCCCGCCCTTGCACGTGACTCCCTTAGGC-3') ou mutée (5'-biotine-CCCCCGCCCTTGAAGCTTACTCCCTTAGGC-3') afin de capter les protéines qui y sont associées. Les oligos sens de type sauvage (WT) et muté pour le Ebox, biotinylés ainsi que leurs brins complémentaires ont été dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min puis on les laisse hybrider jusqu'à température ambiante pour générer des séquences oligonucléotides doubles brins. Des billes de streptavidine (1 mg; Streptavidin Magnetic Beads, BioLabs, New England, Canada) ont été résuspendues dans le tampon W&B (wash and binding) (1×) (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 1 M de NaCl et 1 mM de EDTA) et incubées en présence de 1500 pmol d'oligos doubles brins formés pendant 15 min à

température ambiante. Après des étapes de lavage dans le même tampon, les billes liées aux oligos biotinylés ont été incubées à température ambiante pendant 15 min en présence de 500 µg d'extraits nucléaires de gonades prélevés sur des souris de type sauvage à deux stades de développement (prépubère et adulte) dans du tampon d'hybridation 10× (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 1 M de NaCl, 100 mM de MgCl₂, 0.2 mM de EDTA et 1 mM de DTT) auquel on a rajouté 100 mg/ml de BSA et 20 µg of PolydI:dC pour bloquer la liaison de protéines non spécifiques. Les billes ont ensuite été lavées avec un tampon pauvre en sel (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% NP-40, 1 mM EDTA and 75 mM KCl) afin d'optimiser la formation de liaison spécifique puis éluées avec 30 µl de SDS 0.1%. Comme témoin négatif, des billes ont été incubées en présence d'extraits nucléaires sans oligos. J'ai appliqué le même protocole en utilisant des extraits nucléaires de cellules de Sertoli comme alternative à l'utilisation d'extraits de tissus entiers.

Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel SDS-PAGE 10-12% pendant 1 h à 100 V puis le gel a été incubé dans une solution de fixation (50% méthanol, 10% acide acétique) pendant toute la nuit à température ambiante. Après l'étape de fixation, le gel a été rincé dans 20% d'éthanol pendant 10 min et avec de l'eau milliQ pour la même durée. Le gel a ensuite été réduit dans une solution de thiosulfate de sodium (1×) pour 2 min et rincé 2 fois avec de l'eau pendant 10 min chacun. Le gel a par la suite été coloré au nitrate d'argent (2g/l) pendant 30 min et rincé à l'eau pendant 20 sec. Pour révéler les bandes, le gel a été incubé dans une solution de développement (3% de carbonate de sodium, 0,05% de formaldéhyde et 10 mg/l de thiosulfate de sodium) jusqu'à l'apparition des bandes (moins de 2 min). Le gel a ensuite été incubé dans l'acide acétique 10% pour stopper la réaction de développement. Le gel a été rincé à l'eau et les bandes d'intérêt (modulées à la baisse en fonction de la mutation du motif Ebox) ont été extraites du gel et conservées à -80 °C en vue de leur analyse en spectrométrie de masse (Service externe, IRCM).

Tableau 2.5 Séquence des oligonucléotides utilisés pour capter les protéines nucléaires qui pourraient se lier au motif Ebox

Nom des oligonucléotides	Séquence
Ebox wt sens	5'- biotine -CCCCCGCCCTTGCACGTGACTCCCCTTAGGC-3'
Ebox wt antisens	5'-GCCTAAGGGAGTCACGTGCAAGGGCGGGGG-3'
Ebox mut sens	5'- biotine -CCCCCGCCCTTGAAGCTTACTCCCTTAGGC-3'
Ebox mut antisens	5'-GCCTAAGGGAGTAAGCTTCAAGGGCGGGGG-3'

2.7 Collecte de sérum et quantification hormonale

Le sang circulant des souris mâles adultes *Gata4*^{S105A} et de type sauvage a été recueilli dans des microtubes (Sarstedt inc., Montréal, Canada) contenant du lithium héparine. Suivant le prélèvement, les échantillons ont été laissés à coaguler pendant 1 heure à température ambiante puis centrifugés une première fois pendant 10 min à 3000 RPM. Une deuxième centrifugation a été réalisée à partir du surnageant pour retirer les fins sédiments. Le sérum recueilli a été stocké à -80 °C jusqu'à utilisation. Des essais ELISA pour la quantification de la testostérone ont été réalisés en utilisant le kit de Cayman Chemical (Cayman Chemical Co., Ann Harbour, MI). Chaque échantillon a été dilué 20 fois (1/20) et 50 fois (1/50) en utilisant le tampon EIA, afin d'obtenir des lectures dans la gamme de la courbe standard. La lecture de la microplaque a été réalisée en utilisant un lecteur ThermoMaxmicroplate (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Nous avons parallèlement procédé à la quantification par ELISA de la LH (hormone lutéinisante) selon les instructions du fabricant du kit (Abnova, la ville de Taipei, Taiwan).

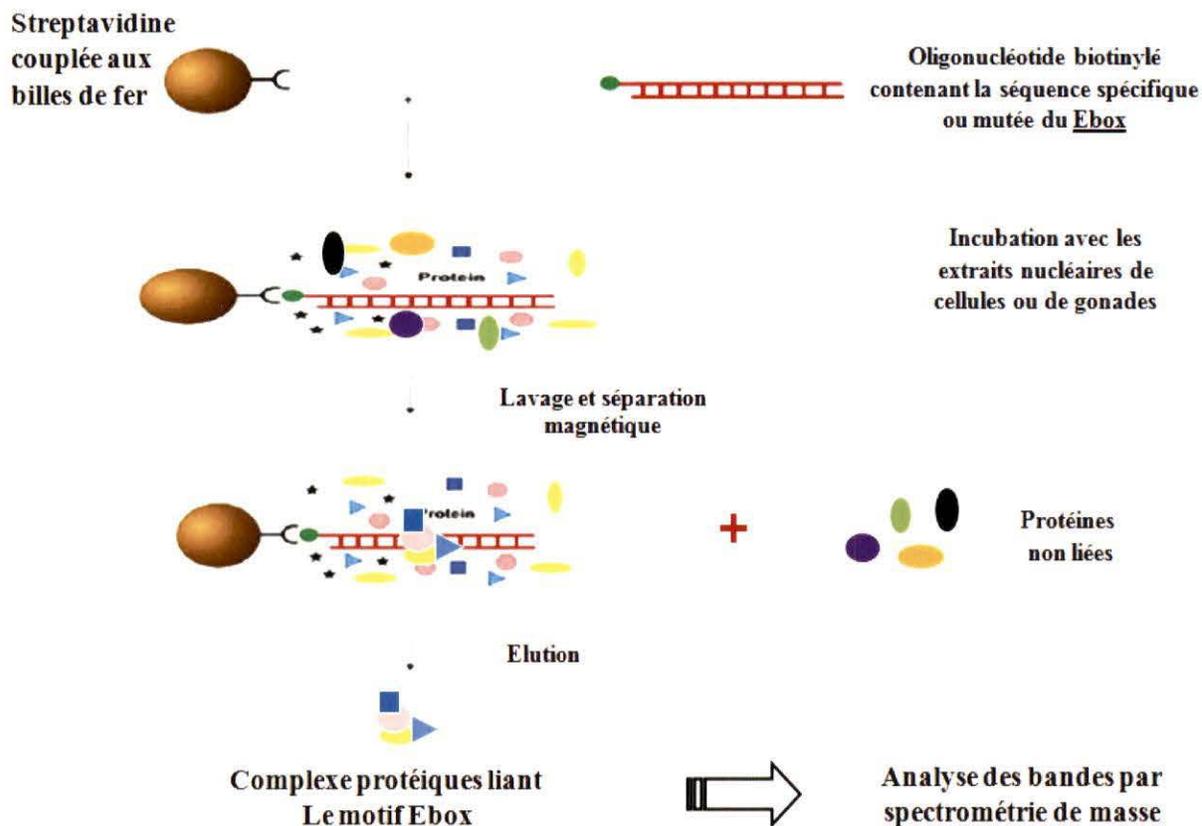


Figure 2.6 Stratégie utilisée pour l'identification des facteurs se liant au motif Ebox du promoteur proximal de *Gata4* dans les gonades à différents stades de développement.

Chaque échantillon a été dosé tel quel ou dilué 4 fois (1/4) afin d'obtenir des lectures dans la gamme de la courbe standard. La lecture de la microplaque a également été réalisée en utilisant le lecteur ThermoMaxmicroplate (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA).

2.8 Essais ELISA

Pour le dosage de la testostérone, des dilutions appropriées de chaque échantillon ainsi que des standards ont été préparés dans du tampon EIA fourni dans le kit Cayman Chemical Company. Chaque échantillon et le standard dilué ont été déposés dans les puits correspondants d'une plaque. Le traceur AChE (acétylcholinestérase) et l'antisérum

ont également été déposés dans les puits recommandés. La plaque a ensuite été recouverte d'une pellicule de plastique et incubée pendant 2 heures à température ambiante sur un agitateur. La plaque a été rincée 5 fois par immersion dans la solution de lavage. Pour le développement, du réactif d'Ellman's a été ajouté à chaque puits et le traceur AChE au puits correspondant. La plaque a de nouveau été recouverte avec une pellicule de plastique et placée dans une boîte à l'abri de la lumière. La boîte a été incubée pendant 60-90 minutes à température ambiante sur un agitateur. La pellicule a été retirée délicatement et la plaque a été lue à une longueur d'ondes de 405 nm.

Pour le dosage de la LH, le standard et l'échantillon ont été déposés dans les puits appropriés d'une plaque de 96 puits fournie par le manufacturier (Abnova). L'enzyme conjugué a été ajouté dans chaque puits. L'ensemble a été mélangé pendant 30s et la plaque a été incubée pendant 2h à 37°C. Le contenu de la plaque a ensuite été déversé et 5 lavages successifs de la plaque ont été effectués avec du tampon de lavage. Les puits ont été totalement égouttés en tapant fermement la plaque retournée sur du papier absorbant puis de la solution de révélation TMB a été déposée dans chaque puits. Après 10 secondes de mélange, la plaque a été placée à l'abri de la lumière dans une boîte et incubée pendant 20 minutes à température ambiante. Pour arrêter la réaction, du HCl 2N a été rajouté à chaque puits et la plaque a été remuée pendant 30 secondes jusqu'à l'observation d'un changement de couleur (bleu à jaune). La lecture de la plaque a été réalisée à une longueur d'ondes de 450 nm.

2.9 Évaluation de la fertilité

Compte tenu du rôle critique de GATA4 dans la fonction des gonades, il était important d'évaluer la fécondité des souris dans nos différents modèles de souris transgéniques (*Gata4*^{EboxKo} et *Gata4*^{S105A}). Trois paramètres ont servi pour l'évaluation de la fécondité: le taux d'accouplement qui désigne le pourcentage du nombre de femelles présentant un bouchon vaginal sur le nombre total de femelles en croisement, le taux de gestation qui représente le pourcentage du nombre de femelles gestantes sur le nombre de femelles inséminées et le nombre moyen de petits par portée. Enfin, en considérant la régulation exercée par GATA4 sur plusieurs gènes impliqués dans la détermination du

sexe et considérant les possibles anomalies liées au développement du sexe associés à ces mutations, incluant le phénomène de réversion sexuelle, le ratio mâle/femelle sur le nombre total de petits par lignée a également été déterminé. Pour réaliser cette expérience, trois couples de souris adultes (du même âge) de chaque génotype ont été croisés et laissés en croisement jusqu'à la 3^{ème} portée.

2.10 Décompte spermatique

La fertilité des souris mâles a également été analysée en évaluant la production de spermatozoïdes. Pour ce faire, un segment de même longueur de la queue de l'épididyme a été prélevé sur chaque souris et délicatement dissocié dans 3 ml de PBS 1×. L'ensemble a été incubé à 37°C + 5% CO₂ pendant 10-15 min pour faciliter la libération des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes ont ensuite été fixés avec du PFA 0,4% pendant 1h à 4°C. 5µl de chaque échantillon ont été déposés sur un hémacytomètre pour le décompte des spermatozoïdes. Trois souris de chaque génotype ont été analysées.

CHAPITRE III : RÉSULTATS

I- RÔLE ENDOGÈNE DU MOTIF EBOX DANS LA TRANSCRIPTION DE *GATA4*

La première partie des données de cette thèse a été publiée est tirée dans la revue *PLoS One* (2011;6 (12):e29038. doi: 10.1371/journal.pone.0029038. Epub 2011 Dec 13). Ce travail a mobilisé des membres des laboratoires des Drs Nicolas Pilon (BIOMED/UQAM) et Robert Viger (CRBR/CHUL/Québec) que je tiens une nouvelle fois à remercier.

3.1 Le croisement de souris possédant la mutation Ebox du promoteur *Gata4* 1a mais ayant conservé la cassette de sélection Neo ne génère pas d'homozygotes

Malgré l'importance du facteur GATA4 dans le développement et la fonction des gonades chez les mammifères, nos connaissances sur les mécanismes qui contrôlent l'expression de ce gène essentiel demeurent incomplètes. Dans le but d'identifier de nouveaux éléments régulateurs de l'expression de *Gata4*, notre laboratoire a caractérisé une séquence promotrice proximale du gène *Gata4* de rongeur (5 kb de long et appelée promoteur 1a) qui dirige l'expression d'un transcript majeur du gène *Gata4* *in vitro* et *in vivo* (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014; Mazaud Guittot *et al.*, 2009; Mazaud Guittot *et al.*, 2007). Parmi ces 5 kb de séquences a été identifié un motif Ebox pour la liaison des facteurs ubiquitaires de la famille USF. Ce motif est essentiel pour l'activité du promoteur *Gata4* 1a dans un contexte cellulaire (*in vitro*). Afin de démontrer l'importance de cet élément Ebox dans un contexte *in vivo*, nous avons généré une lignée de souris *Gata4*^{EboxKO} dont le génome arbore une mutation de ce motif.

La mutation a consisté à convertir le motif Ebox endogène du promoteur 1a de *Gata4* en site HindIII. En plus de la mutation proprement dite, une cassette de sélection à la néomycine (Neo) flanquée de sites LoxP a été rajoutée. L'ADN muté a ensuite été transféré dans des cellules souches embryonnaires et intégré dans le génome par

recombinaison homologue. Des clones positifs de cellules souches ayant résistées au traitement à la néomycine et donc ayant intégrées la mutation du motif Ebox ont été isolées et identifiées par Southern blot (figure 3.1A). Ces clones ont été micro-injectées dans des blastocystes de souris C57BL/6 afin de générer des souris chimères dont le croisement avec des souris C57BL/6 nous a permis d'obtenir des souris hétérozygotes $Gata4^{+}/EboxKO-Neo$ (figure 3.1B) ayant conservé la cassette de sélection Neo. Après avoir obtenu les souris hétérozygotes $Gata4^{+}/EboxKO-Neo$, nous les avons croisées entres-elles afin d'obtenir des souris $Gata4^{EboxKO-Neo}$ homozygotes. Fait intéressant, aucun petit avec un génotype homozygote n'a pu être obtenu.

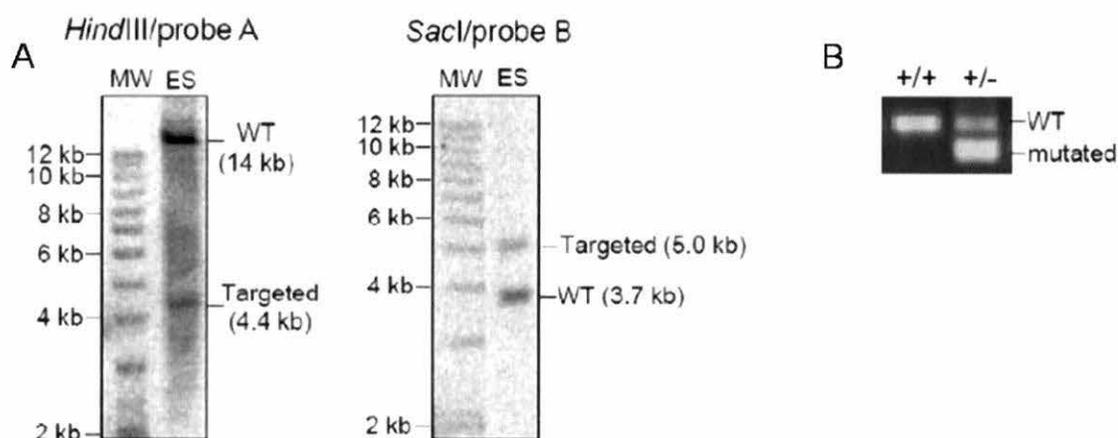


Figure 3.1 Vérification de l'évènement de recombinaison dans les clones EboxKO de cellules souches embryonnaires sélectionnés

(A) Analyses Southern confirmant l'évènement de recombinaison prédit à la fois sur les extrémités 5' et 3' pour un clone de cellules souches embryonnaires utilisé pour générer des chimères. L'ADN génomique a été analysé en utilisant une combinaison d'enzymes de restriction et de sondes indiquée. MW : échelle de poids moléculaire 1kb ; ES : ADN génomique de cellules souches embryonnaire; WT: ADN de type sauvage; Targeted: ADN ciblé issu d'un clone portant la mutation (B) Analyse par PCR de l'ADN génomique de souris issue de la progéniture F1 en utilisant les amorces 1 et 2 pour amplifier l'allèle de type sauvage et les amorces 1 et 3 pour identifier l'allèle muté (pour les amorces voir tableau 2.1). Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

3.2 Une souris possédant la mutation Ebox du promoteur *Gata4* 1a mais conservant la cassette de sélection Neo conduit à une mortalité embryonnaire

L'absence de souris $Gata4^{EboxKO-Neo}$ homozygotes viables à la naissance associée à la faible proportion d'embryons correspondants a suggéré une létalité embryonnaire qui se produit à un stade précoce du développement. Pour vérifier cette possibilité, nous avons réalisé des investigations *in utero* sur des embryons au stade E9,5 issus de croisements de souris $Gata4^{+/EboxKO-Neo}$ hétérozygotes. Le stade E9,5, correspond à la phase la plus tardive à laquelle des embryons *Gata4*-nuls non résorbés peuvent être obtenus (Kuo *et al.*, 1997; Molkenin *et al.*, 1997). Cette analyse a permis de constater que des embryons homozygotes $Gata4^{EboxKO-Neo}$ étaient bien présents *in utero* mais étaient ensuite résorbés. Cependant le faible ratio d'homozygotes obtenu à ce stade ne suivait pas la distribution (de 25%) prédite par les lois de Mendel puisqu'ils ne représentaient que 13,6 % (32/233) du total des embryons génotypés. Sur le plan phénotypique, ces embryons homozygotes présentaient également de sévères anomalies caractérisées par une absence de fermeture de la cavité ventrale ainsi qu'un défaut de formation du tube cardiaque (figure 3.2A, B). Le ratio non-mendélien tout comme les défauts morphologiques associés aux homozygotes $Gata4^{EboxKO-Neo}$ ressemblaient fortement au phénotype des souris *Gata4*-nulles (Kuo *et al.*, 1997; Molkenin *et al.*, 1997) et suggéraient une réduction sévère de la protéine GATA4 qui a d'ailleurs été confirmée par des expériences d'immuno-histochimie que nous avons réalisées sur des embryons homozygotes entiers au stade E9,5 (figure 3.2C, D). Tel que montré à la figure 3.2D, les homozygotes $Gata4^{EboxKO-Neo/EboxKO-Neo}$ étaient plus petits que les embryons de type sauvage au même stade et présentaient une morphologie anormale.

Dans le but de générer des souris homozygotes viables portant la mutation et de déterminer si la létalité embryonnaire émane de la mutation Ebox ou de la présence de la cassette Neo, nous avons réalisé des croisements avec une autre lignée. En effet, dans l'éventualité d'une mortalité embryonnaire précoce due à la présence de la cassette Neo, nous avons pris la peine dans notre construction d'insérer des sites LoxP. Ces sites ont permis le retrait facile de la cassette Neo dans tous les tissus embryonnaires par simple

croisement des hétérozygotes $Gata4^{+/EboxKO-Neo}$ avec des souris Meox2-Cre (Tallquist et Soriano, 2000) qui expriment la recombinaison Cre dans l'épiblaste (Figure 3.3). Tel que présenté dans le tableau 3.1, les souris hétérozygotes résultants ainsi que les souris homozygotes $Gata4^{EboxKO}$ (sans la cassette de sélection Neo) étaient viables et fertiles. Leur progéniture présentait également une apparence normale depuis la naissance et au cours de leur croissance. Cette analyse indique que la présence de la cassette Neo est définitivement responsable de la létalité embryonnaire des embryons $Gata4^{EboxKO-Neo}$ homozygotes. Ces souris n'ont donc plus été utilisées pour la suite du projet.

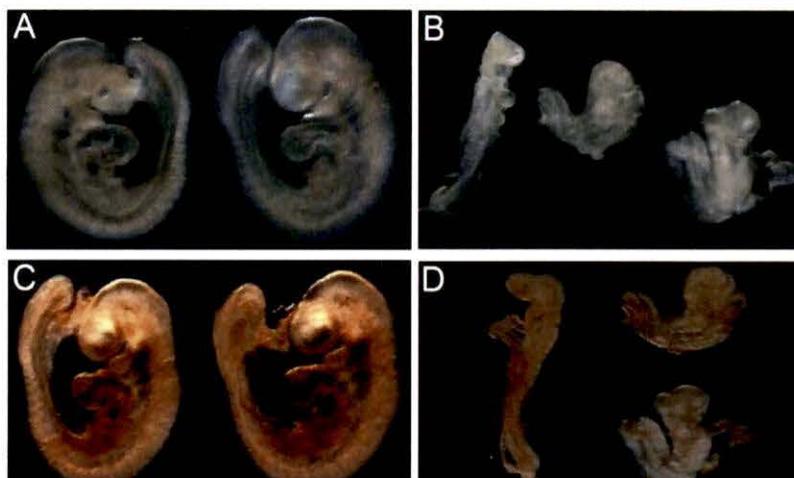


Figure 3.2 Létalité embryonnaire des souris homozygotes $Gata4^{EboxKO-Neo}$

En comparaison avec les embryons de type sauvage (A) au stade E9,5, les embryons homozygotes $Gata4^{EboxKO-Neo/EboxKO-Neo}$ (B) présentent un retard de développement et de sévères anomalies morphologiques caractérisées par un défaut rostro-caudal et ventro-latéral de la fermeture de la cavité ventrale ainsi qu'un tube cardiaque anormal. Immunohistochimie sur les embryons de type sauvage (C) et homozygotes $Gata4^{EboxKO-Neo/EboxKO-Neo}$ (D) montrant une diminution drastique du niveau de la protéine GATA4 chez les mutants. Grossissement 16X. Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

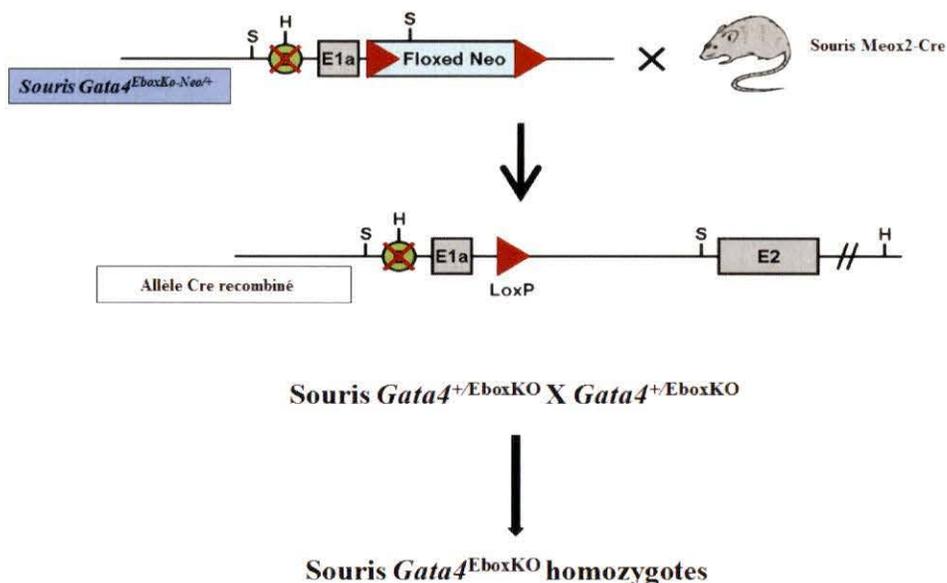


Figure 3.3 Schéma résumant la stratégie de retrait de la cassette Neo pour l'obtention des souris homozygotes $Gata4^{EboxKO}$

Tableau 3.1 Test de fertilité pour les souris *Gata4*^{EboxKO} homozygotes

Paramètres analysés	WT	Mutant
Taux d'accouplement *	36,4% (12/33)	42% (13/31)
Taux de gestation **	58,3% (7/12)	53,9% (7/13)
Nombre moyen de petits par portée	6,4	7
*Nombre de femelles présentant un bouchon vaginal par femelles en croisement		
**Nombre de femelles gestantes sur le nombre de femelles ayant présenté un bouchon vaginal		

3.3 Le motif Ebox est un élément régulateur spécifique et essentiel pour la transcription à partir de l'exon E1a du gène *Gata4* *in vivo*

3.3.1 Effet de la mutation dans les gonades

Bien que les souris *Gata4*^{EboxKO} ne présentaient des déficiences morphologiques majeures ni des perturbations au niveau de la fertilité (tableau 3.1), nous avons toutefois examiné la conséquence de la mutation Ebox sur l'expression de *Gata4*. Notre hypothèse était que le motif Ebox est important pour l'expression du transcrite E1a. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'expression des transcrits E1a et E1b (non contrôlé par l'élément Ebox) par PCR quantitative dans les gonades et dans d'autres tissus exprimant GATA4 notamment dans le cœur et le foie à différents stades de développement (embryonnaire (E15,5), prépubère (P14) et adulte (3 mois)). Chacun des stades de développement a été choisi pour ses caractéristiques propres. Le stade foetal E15,5 au cours duquel GATA4 est fortement exprimé est un moment important du développement testiculaire puisque la détermination du sexe est complétée. Au stade prépubère P14, les niveaux de testostérone sont au minimum et la différenciation fonctionnelle des cellules de Sertoli s'effectue. Le stade adulte correspond à la période où

les processus de stéroïdogénèse et de spermatogénèse régulés par GATA4 fonctionnent à plein régime.

Dans les gonades, l'analyse a d'abord révélé que les niveaux d'expression relatifs de chacun des transcrits variaient en fonction du sexe et du stade de développement chez les souris de type sauvage. Dans le testicule, le transcrit E1a est préférentiellement exprimé au stade embryonnaire (figure 3.4A) puis le niveau d'expression de chaque transcrit devient similaire chez les animaux prépubères et adultes. Un profil inversé a cependant été observé dans l'ovaire avec des niveaux d'expression comparable de chaque transcrit au stade E15,5 (figure 3.4A) suivi par une prédominance de l'expression du transcrit E1a à deux semaines et à l'âge adulte (figure 3.4B, C). En accord avec notre hypothèse, nos résultats montrent chez les animaux homozygotes *Gata4*^{EboxKO} une diminution robuste et statistiquement significative de l'expression du transcrit E1a indépendamment du sexe et du stade de développement alors que l'expression du transcrit E1b demeure essentiellement inchangée. La plus forte réduction a eu lieu dans les gonades embryonnaires (89%) (figure 3.4A). Nous avons observé une réduction de 80 et 70% respectivement dans les testicules et les ovaires post-nataux aux stades prépubère et adulte (figure 3.4B, C). Contrairement à ce qu'on a observé pour le transcrit *Gata4* E1a, les niveaux des transcrits *Gata4* E1b ont montré soit aucun changement entre les types sauvage et mutant (figure 3.4A, C) ou une augmentation légère mais significative des niveaux d'expression du transcrit E1b spécifiquement dans les testicules embryonnaires (figure 3.4A).

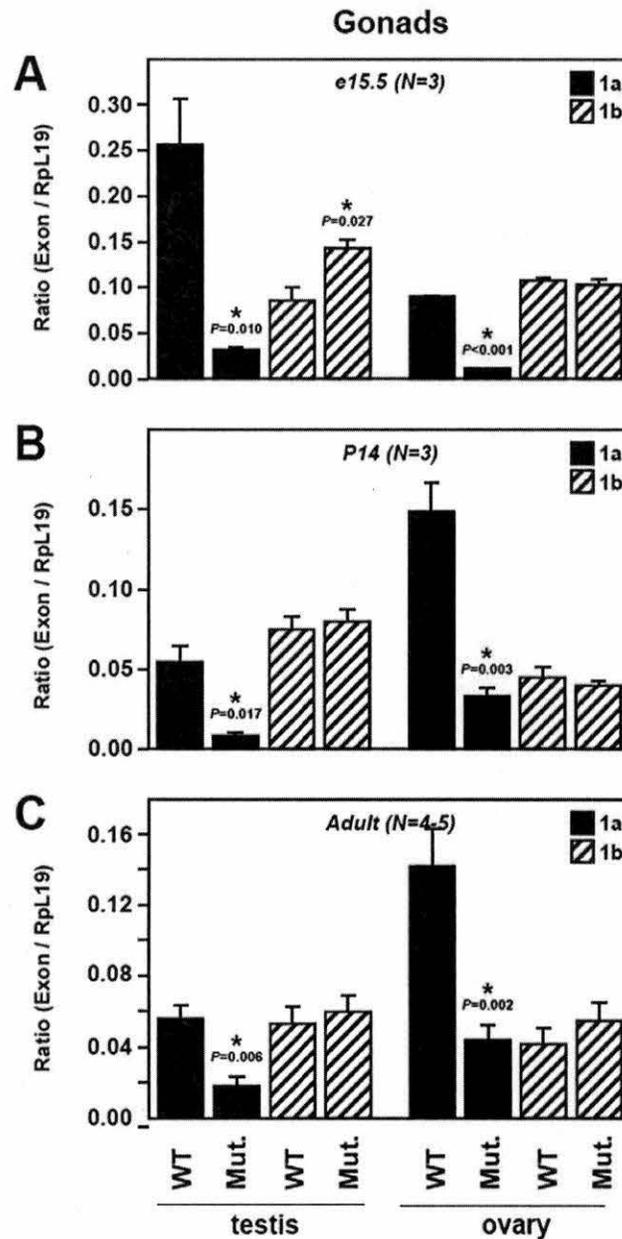


Figure 3.4 Comparaison des niveaux d'expression des transcrits *Gata4* E1a et E1b dans les gonades provenant des souris de type sauvage (WT) et *Gata4*^{EboxKO}

Le niveau d'expression des transcrits E1a et E1b dans les gonades de souris au stade embryonnaire E15.5 (A), prépubère P14 (B) et adulte (C) ont été évalués par PCR quantitative. Les données sont présentées en unités arbitraires en tant que rapport entre la variation du niveau d'expression de *Gata4* E1a ou E1b à celle du gène de référence *Rpl19*. N indique le nombre d'animaux examinés. Les niveaux d'expression des transcrits ont été analysés en utilisant le test t de Student; $P < 0,05$ était considéré comme significative. Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

3.3.2 Effet de la mutation Ebox dans les tissus extra-gonadiques

GATA4 est un facteur essentiel pour le développement et la fonction de plusieurs tissus. Nous avons donc analysé un large éventail de tissus exprimant ce facteur. Dans les tissus extra-gonadiques, on a également observé chez les souris de type sauvage une variation des niveaux d'expression relatifs des transcrits *Gata4* E1A et E1b. Le transcrit E1a est majoritairement exprimé dans le cœur embryonnaire alors que l'expression du transcrit E1b prédomine dans le cœur adulte (figure 3.5A) et les deux transcrits sont exprimés de manière similaire chez les animaux prépubères (figure 3.5B). Dans le foie, le transcrit E1a est principalement exprimé dans les tissus embryonnaires et adultes (figure 3.5D) alors que l'expression du transcrit E1b est prédominante chez les souris prépubères (figure 3.5E). Tout comme nous avons observé avec les tissus gonadiques, les souris homozygotes *Gata4*^{EboxKO} présentaient une importante diminution de l'expression du transcrit *Gata4* E1a dans le cœur et le foie aux stades embryonnaire, prépubère et adulte. Similaire au testicule fœtal (figure 3.5A), une augmentation légère mais significative des niveaux d'expression du transcrit *Gata4* E1b a également été observée spécifiquement au stade embryonnaire dans le cœur et le foie (figure 3.5A).

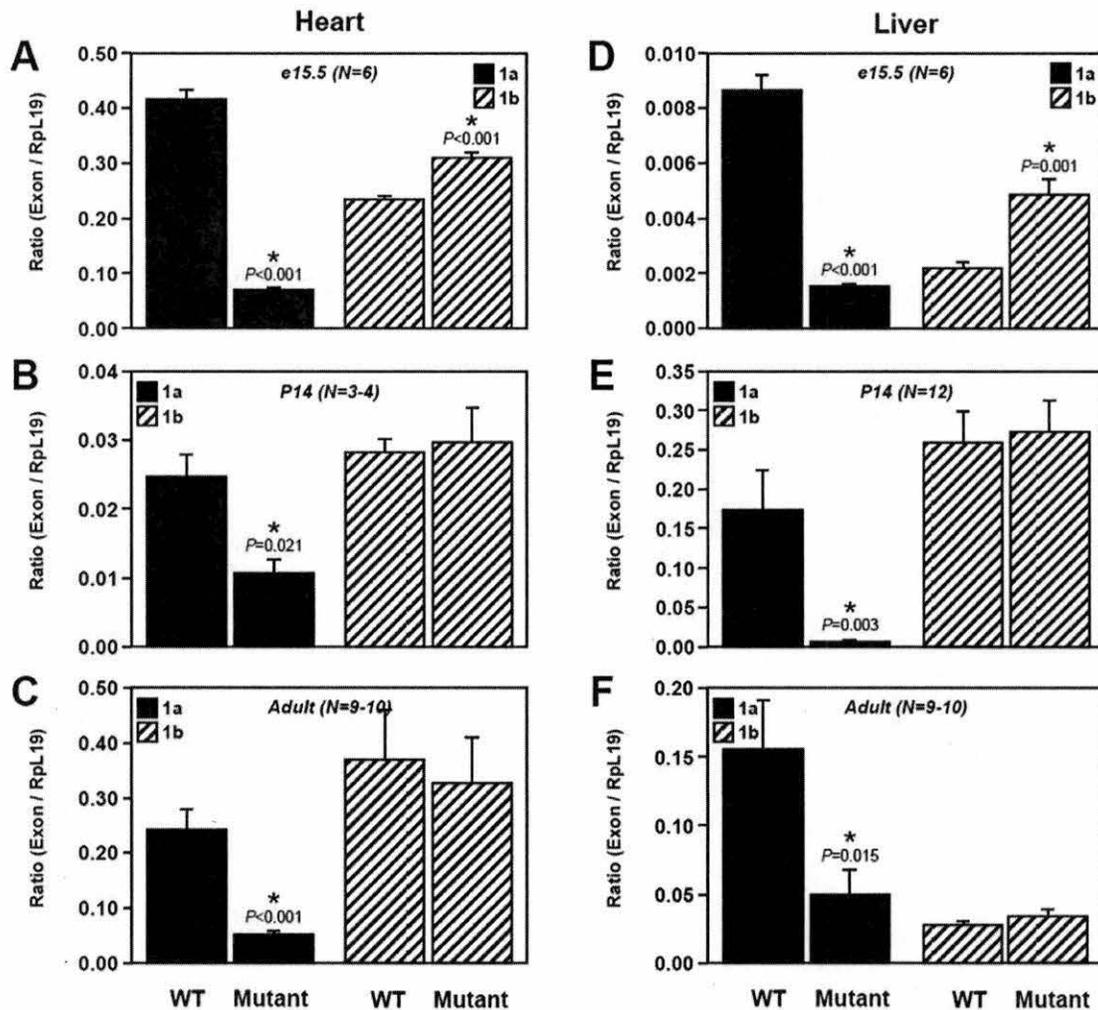


Figure 3.5 Effet d'une mutation du motif Ebox du promoteur *Gata4* 1a sur l'expression des transcrits E1a et E1b dans les tissus extra-gonadiques

Les niveaux d'ARNm des transcrits *Gata4* E1a et E1b dans le cœur (A-C) et le foie (D-F) au stade embryonnaire (A, D), prépubère (B, E) et adulte (C, F) ont été évalués par PCR quantitative. Les données sont présentées en unités arbitraires en tant que rapport entre la variation du niveau d'expression des transcrits *Gata4* E1a ou E1b à celle du gène de référence *Rpl19*. N indique le nombre d'animaux examinés. Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

3.4 Une forte réduction de l'expression du transcrit *Gata4* E1a n'entraîne pas de phénotype manifeste dans les gonades

Dans le but d'évaluer l'impact de la réduction des niveaux d'expression du transcrit *Gata4* E1a sur la morphologie et le fonctionnement des gonades, des coupes histologiques de testicules (figure 3.6) et d'ovaires (figure 3.7) préparées à partir des souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{EboxKO} ont été analysées au stade embryonnaire, prépubère et adulte. Tel que présenté à la figure 3.6A, le stade foetal du testicule est caractérisé par la présence de cordons testiculaires et de cellules stéroïdogéniques (cellules de Leydig) dans l'espace entre eux. Ce stade est également caractérisé par la différenciation des cellules de Sertoli, une fonction qui dépend étroitement de la présence de GATA4. L'apparence histologique du testicule à ce stade était similaire dans les souris de type sauvage et les souris *Gata4*^{EboxKO}. Au stade prépubaire (figure 3.6C), on note l'apparition des tubes séminifères délimités distinctement. Ils contiennent les cellules de Sertoli et germinales. Dans le tissu conjonctif localisé entre les tubes se retrouvent des cellules de Leydig qui sécrètent de la testostérone pour parachever la différenciation fonctionnelle des cellules de Sertoli. Aucune différence n'a été observée dans l'apparence histologique du testicule chez les souris homozygotes *Gata4*^{EboxKO} (figure 3.6D). Enfin, le stade adulte est marqué par une production soutenue de testostérone par les cellules de Leydig adultes, disposées dans l'espace entre les tubes séminifères, et stimulées par les gonatrophines telles que la FSH et la LH (Dharia *et al.*, 2004). La spermatogenèse déclenchée à ce stade se traduit par la production de spermatozoïdes visibles dans la lumière des tubes séminifères (figure 3.6E). Bien que GATA4 soit impliquée dans la production de testostérone et la spermatogenèse, la mutation du motif Ebox n'a également aucune incidence sur l'apparence histologique du testicule adulte chez les souris *Gata4*^{EboxKO} (figure 3.6F).

Dans l'ovaire foetal des souris de type sauvage, les cellules germinales primordiales fusionnent avec les cellules somatiques pour former les cordons ovigères. À ce stade, la différenciation de l'ovaire est marquée par l'entrée des cellules germinales en prophase méiotique (ovocyte I) jusqu'à la naissance (figure 3.7A). La mutation Ebox n'a

aucun impact sur l'apparence histologique des ovaires chez les souris homozygotes *Gata4^{EboxKO}* (figure 3.7B). Au stade prépubère, GATA4 est exprimée dans les cellules somatiques des souris de type sauvage notamment dans les cellules pré-granulosa et thécales. Au début de la folliculogenèse, les cordons ovigères se sont fragmentés et chaque follicule primordial est constitué suite à l'association d'un ovocyte I et d'une assise de cellules pré-granulosa (figure 3.7C). Les cellules thécales entament également leur différenciation autour des follicules en croissance. Elles sécrètent de la testostérone qui sera convertit en œstradiol et par les cellules folliculaires pour la féminisation des voies génitales. À ce stade les ovaires des souris *Gata4^{EboxKO}* présentent le même profil histologique (figure 3.7D). Au stade adulte chez les souris de type sauvage (figure 3.7E), l'expression de GATA4 persiste dans les cellules somatiques incluant les cellules lutéales. Dans le cortex ovarien sont présents des follicules à différents stades de développement (primaire, secondaire, follicule de Graaf) entourée d'une couche de cellules de la granulosa. Les cellules de la thèque se différencient également en thèque interne et externe. Encore une fois, le profil histologique demeure inchangé dans les ovaires des souris *Gata4^{EboxKO}* (figure 3.7F). Cette analyse n'a donc révélé aucune différence notable quant à l'apparence histologique dans les gonades des souris homozygotes *Gata4^{EboxKO}* à tous les stades examinés. En considérant la réduction des niveaux du transcrit E1a, un tel résultat laissait suggérer que les niveaux de la protéine GATA4 n'aient pas été affectés de façon significative dans les gonades des homozygotes *Gata4^{EboxKO}*.

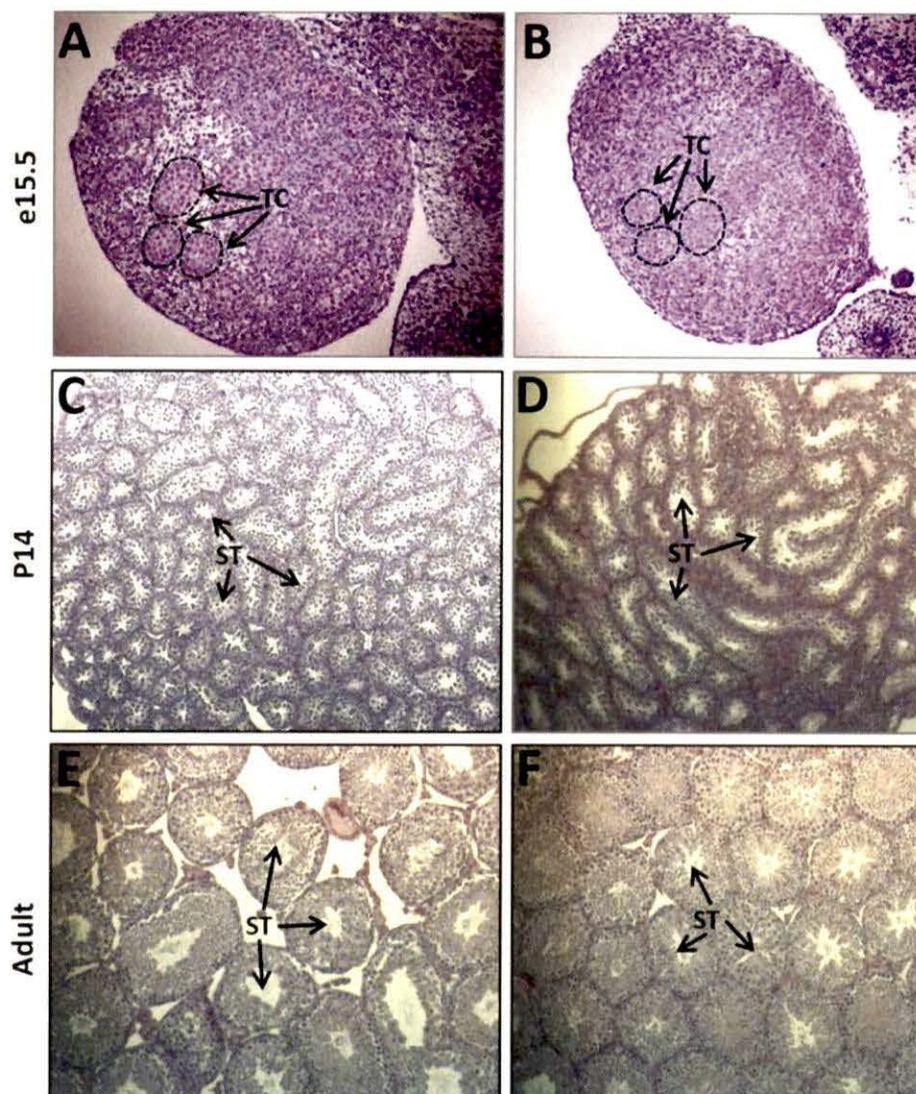


Figure 3.6 La mutation du motif Ebox n'affecte pas la morphologie des testicules des souris *Gata4^{EboxKO}*

Des sections transversales de testicules obtenus de souris de type sauvage (A, C et E) et de souris mutantes (B, D et F) colorées à l'hématoxyline-éosine ont été analysées au stade embryonnaire, prépubère et adulte. Les images ont été prises à un grossissement de 100X. TC, cordon testiculaire; ST, tube séminifère. Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

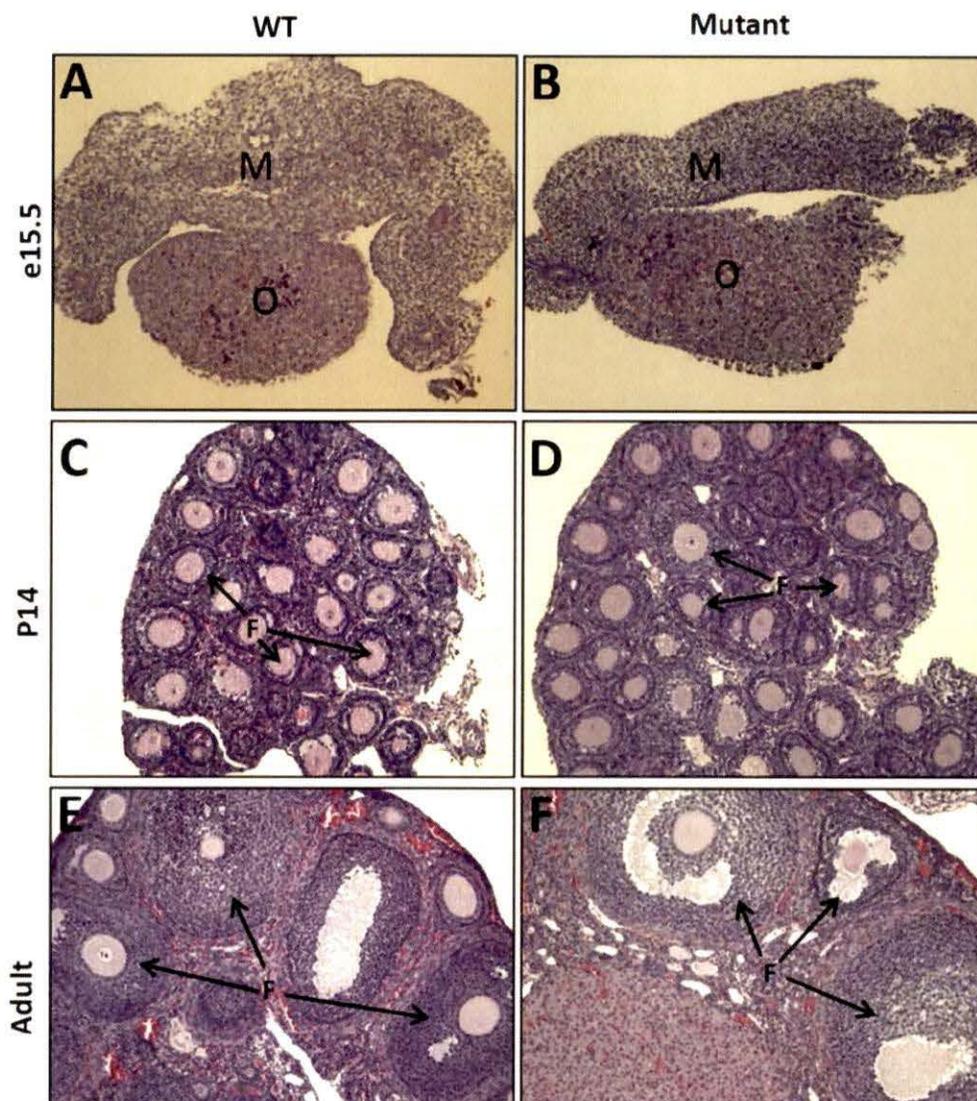


Figure 3.7 La mutation du motif Ebox n'affecte pas la morphologie des ovaires des souris *Gata4^{EboxKO}*

Des sections transversales d'ovaires obtenus à partir de souris de type sauvage (A, C et E) et de souris mutantes (B, D et F) colorées à l'hématoxyline-éosine ont été analysées au stade embryonnaire, prépubère et adulte. Les images ont été prises à un grossissement de 100X. O, ovaire ; M, mésonéphros ; F, follicule. Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

3.5 La forte réduction de l'expression du transcrit E1a de *Gata4* n'affecte pas le niveau de la protéine GATA4

Puisque que nous n'avons pas observé des changements majeures au niveau de l'histologie des gonades avec les souris homozygotes *Gata4*^{EboxKO}, nous avons ensuite vérifié si la forte réduction du transcrit E1a s'accompagnait d'un effet sur le niveau de la protéine GATA4. Pour ce faire, nous avons analysé la présence de GATA4 par immunohistochimie réalisée sur des coupes paraffinées de gonades de souris de type sauvage et *Gata4*^{EboxKO} au stade embryonnaire (E15,5), prépubère (P14) et adulte (3 mois). Comparativement au Western blot qui est un test quantitatif, l'immuno-histochimie a l'avantage de nous permettre d'apprécier la protéine directement dans les types cellulaires (cellules somatiques) qui expriment GATA4.

Au stade foetal, chez les souris de type sauvage, GATA4 marque les cellules somatiques (figure 3.8A). Tôt après la naissance au stade prépubère, la protéine GATA4 est toujours très présente dans les noyaux des cellules de Sertoli en périphérie des tubules séminifères, des cellules de Leydig entre les tubules et les cellules périvitubulaires qui tapissent la périphérie des tubules séminifères (figure 3.8C). Au stade adulte, le niveau de GATA4 est fortement maintenue dans ces différentes cellules (figure 3.8E) notamment dans les noyaux des cellules de Leydig qui produisent de la testostérone à un niveau élevé pour entretenir la spermatogenèse. Un profil similaire a été observé chez les animaux *Gata4*^{EboxKO} au stade embryonnaire, prépubère et adulte (figure 3.8B, D, F).

En ce qui concerne les ovaires, GATA4 est présent à des niveaux modérés dans les cellules somatiques au stade foetal chez les souris de type sauvage (figure 3.9A). Au niveau postnatal, GATA4 est visiblement présent avec un marquage intense dans les cellules de la granulosa. GATA4 marque également les cellules de la thèque, et de façon plus réduite les cellules lutéales (figure 3.9C, E). Encore une fois, le profil de GATA4 demeure inchangé dans les ovaires des souris *Gata4*^{EboxKO} (figure 3.9B, D, F). En conformité avec l'apparence histologique normale ainsi que le maintien de la fertilité, la mutation Ebox n'affecte pas la production de la protéine GATA4 au niveau des gonades.

D'autre part, nous avons également supposé qu'un changement subtil des niveaux de la protéine GATA4, que nous n'avons pas quantifié par Western blot, n'ait pu être détecté par immuno-histochimie. Pour tester cette possibilité, nous avons croisé des souris homozygotes $Gata4^{EboxKO}$ présentant un déficit majeur dans l'expression du transcrit E1a, soit avec des souris hétérozygotes $Gata4^{+/EboxKO-Neo}$ (dont un des allèles a conservé la cassette de sélection Neo), soit avec des souris $Gata4^{+/-}$ présentant un allèle nul (réduction de 50% de la protéine GATA4). L'analyse des souris $Gata4^{EboxKO/EboxKO-Neo}$ et $Gata4^{EboxKO/-}$ résultantes a révélé dans les deux cas que les animaux étaient d'apparence normale (y compris au niveau de leur système reproducteur) et fertiles. Ainsi, même en combinaison avec l'allèle nul, la présence de l'allèle EboxKO ne conduit pas à une diminution fonctionnelle des niveaux de la protéine GATA4.

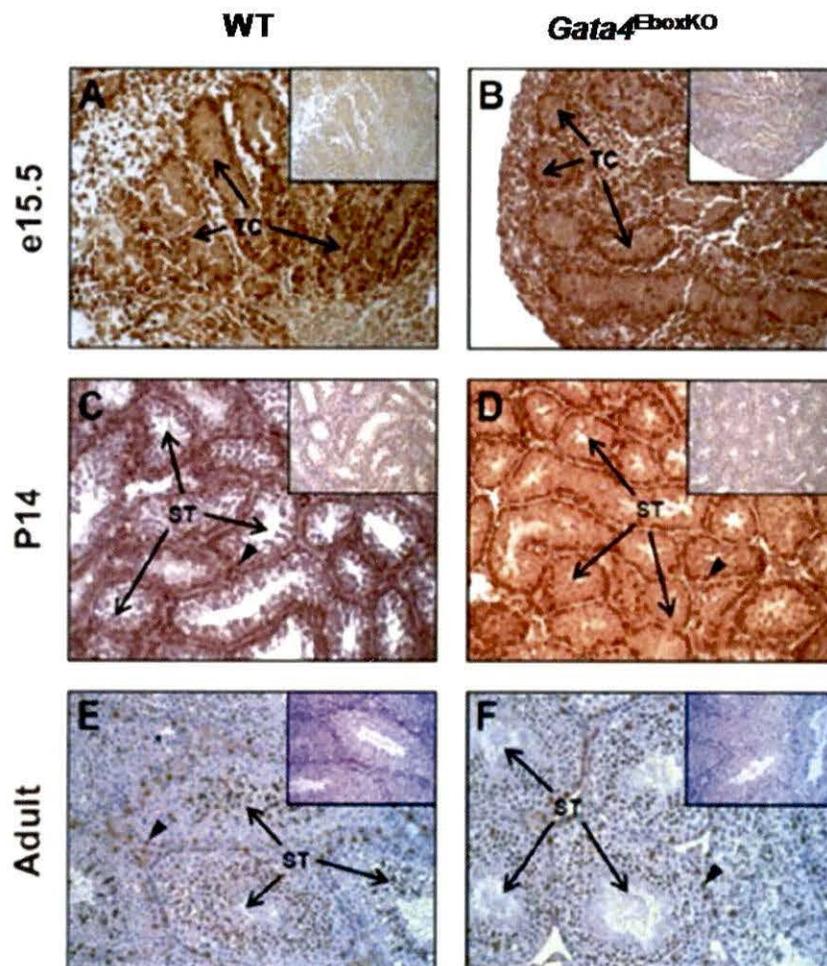


Figure 3.8 La mutation *Ebox* n'affecte pas le niveau de la protéine GATA4 dans les testicules des souris *Gata4*^{EboxKO}

La technique d'immuno-histochimie pour détecter la protéine GATA4 a été réalisée sur des sections paraffinées de testicules obtenues à partir de souris de type sauvage (WT) ou mutant au stade fœtal E15.5 (A, B), prépubère (C, D) et adulte (E, F). Les pointes des flèches indiquent la coloration intense caractéristique habituellement détectée dans les noyaux des cellules de Sertoli. Encarts: contrôle sans anticorps primaire. Les images ont été prises au grossissement 200x. TC, cordon testiculaire ; ST, tube séminifère ; Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

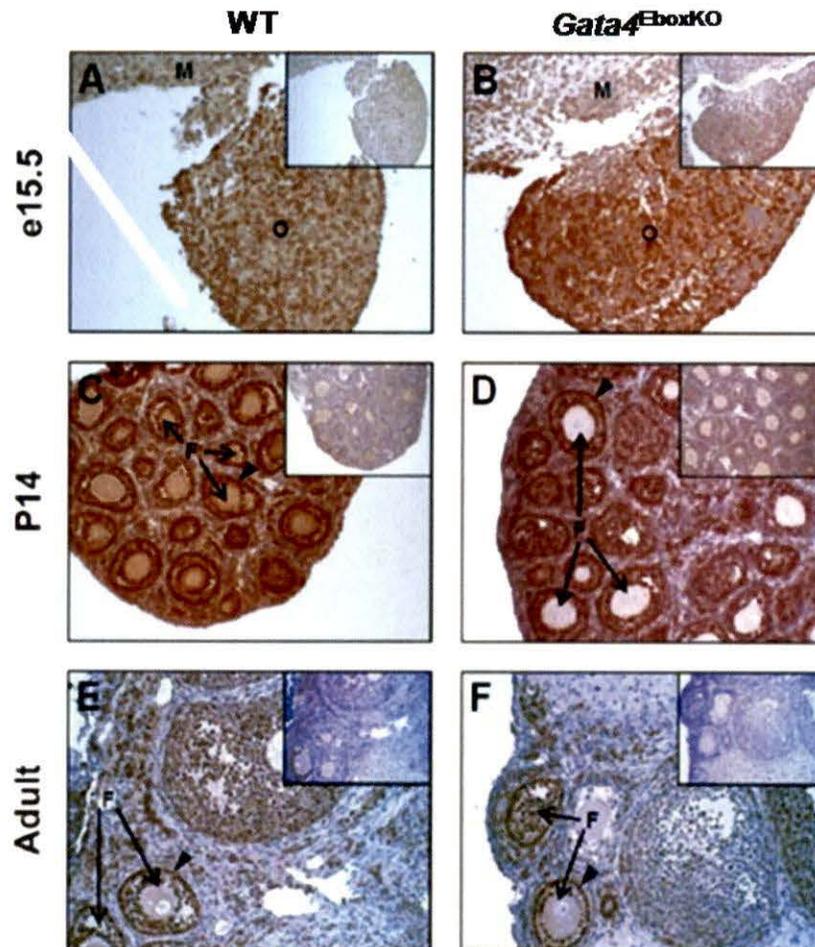


Figure 3.9 La mutation *Ebox* n'affecte pas le niveau de la protéine GATA4 dans les ovaires des souris *Gata4*^{EboxKO}

La technique d'immuno-histochimie pour détecter la protéine GATA4 a été réalisée sur des sections paraffinées d'ovaires obtenues à partir de souris de type sauvage (WT) ou mutant au stade fœtal E15.5 (A, B), prépubère (C, D) et adulte (E, F). Les pointes des flèches indiquent la coloration intense caractéristique habituellement détectée dans les noyaux des cellules de la granulosa. Encarts: contrôle sans anticorps primaire. Les images ont été prises au grossissement 200x. O, ovaire; M, mésonéphros; F, follicule. Tiré de Boulende Sab *et al.* (2011).

3.6 Caractérisation des facteurs nucléaires liant le motif E-box du promoteur *Gata4* 1a

L'analyse des souris *Gata4*^{EboxKO} démontre très bien le caractère essentiel de l'élément Ebox pour l'expression endogène des transcrits *Gata4* 1a. La prochaine étape logique de la caractérisation était de compléter l'analyse fonctionnelle du motif Ebox *in vivo* en procédant à l'identification de ses partenaires d'interaction. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de la biotine pour identifier par spectrométrie de masse les facteurs liant le motif Ebox dans les gonades au cours du développement (figure 2.3). Nous avons incubé des extraits nucléaires de gonades de souris de type sauvage prélevés au stade prépubère et adulte avec des oligos couplés à la biotine et contenant soit la séquence du motif Ebox intact, soit un Ebox muté. Les oligos ont préalablement été immobilisés suivant une incubation avec des billes de streptavidine. Après une série de lavages, les complexes protéiques formés par le motif Ebox et les protéines associées ont été élués et séparés sur un gel SDS-PAGE 1D. La visualisation des bandes a été effectuée après coloration du gel au nitrate d'argent. Une analyse comparative entre les bandes présentes obtenues avec le motif Ebox intact comparativement aux bandes observées avec l'oligo portant une mutation du motif Ebox a été réalisée. Les bandes présentes avec l'oligo Ebox intact mais de faible intensité ou totalement absente du gel en présence de l'oligo Ebox muté ont été ciblées, extraites du gel et ont subi une digestion trypsique en vue d'une analyse en spectrométrie. En effet, notre hypothèse était que la mutation Ebox bloque ou entraîne une perte d'affinité conduisant à une diminution du nombre de facteurs liant le motif Ebox endogène.

Un exemple des résultats obtenus est présenté à la figure 3.10. Dans les ovaires adultes (figure 3.10 C), trois bandes autour de 60, 30 et 25 kDa ont été ciblées en présence de l'oligo intact. Leur signal respectif a diminué d'intensité avec la mutation Ebox. Dans les testicules prépubères (A), une bande d'environ 100 kDa nettement visible en présence de l'oligo Ebox intact l'est moins en présence de l'oligo Ebox muté et est totalement absente dans le témoin négatif contenant les billes seules sans oligos. Deux autres bandes autour de 55 et 45 kDa présentes avec l'oligo Ebox intact sont très

faiblement visibles avec l'oligo muté. Les bandes isolées à partir d'extraits de testicules prépubères n'ont pas été analysées par spectrométrie.

Dans les testicules adultes (B), nous avons ciblé et extrait une bande autour de 60 kDa présente avec l'oligo intact et absente en présence de l'oligo Ebox muté. Cette bande a été analysée en spectrométrie de masse (service externe IRCM/ Montréal). Les résultats de l'analyse spectrométrique réalisés après digestion enzymatique et comparaison du profil obtenu avec ceux issus d'une banque d'origine murine, ont identifié un nombre de facteurs (liste non exhaustive, tableau 3.2) dont la taille proposée oscillait entre 38-69 kDa. Dans la majorité des cas, cette taille était trop petite en comparaison avec le 60 kDa découpé du gel (figure 3.10B). En ce qui concerne les ovaires adultes, nous avons isolé trois bandes (1, 2 et 3) (figure 3.10C) que nous avons également fait analyser par spectrométrie de masse. Pour chacune des trois bandes analysées, la taille des protéines identifiées, dont quelques exemples sont rapportés dans le tableau 3.3, ne correspondait pas à celle des bandes découpées du gel.

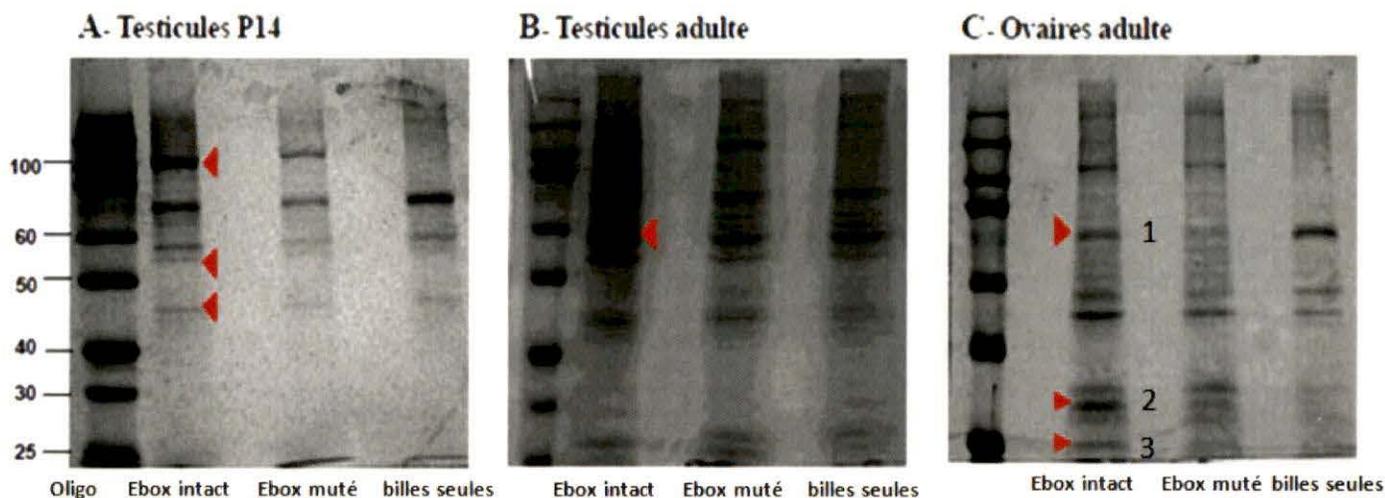


Figure 3.10 Isolation et identification des facteurs liant le motif Ebox du promoteur 1a de *Gata4* dans les gonades

La purification des facteurs protéiques liant le motif Ebox a été effectuée en utilisant une approche telle que décrite à la figure 2.3. Les protéines se liant aux oligos Ebox intact et muté ont été séparées par migration sur gel SDS-PAGE 1D et les bandes protéiques visualisées par coloration au nitrate d'argent. Sont présentés les résultats obtenus avec des extraits de testicules de souris prépubères (A) ainsi que des testicules (B) et ovaires au stade adulte (C). Les triangles en rouge indiquent les bandes que nous avons ciblées et extraites en vue de leur identification par spectrométrie de masse.

Nous avons cependant noté que pour la bande 2, la taille des facteurs identifiés se rapprochait de celle attendue de 30 KDa de la bande découpée sur gel. Les résultats non satisfaisants obtenus après l'analyse spectrométrique nous ont laissé penser que l'abondance de type cellulaire, notamment la présence de cellules germinales dans un tissu entier, pourrait empêcher une analyse nette. Aussi, nous avons opté à utiliser une lignée homogène d'un type cellulaire pour contourner cet écueil. C'est dans cette optique que nous avons choisi de réaliser notre expérience en utilisant comme témoin positif, des extraits nucléaires d'une lignée de cellules de Sertoli (MSC-1).

Tableau 3.2 Analyse spectrométrique de la bande éluée à partir d'extraits de testicule adulte après digestion trypsique

Protéine proposée	Score	Poids moléculaire suggéré (KDa)	Peptides tryptiques	N° d'accession
Y-box-binding protein 2	1342	38,058	22	gi 117956377
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	344	69,790	7	gi 2500527
Tubulin beta-5	697	50,095	12	gi 7106439
RNA binding protein MSY4	411	38,718	11	gi 7385223
U1RNA-associated 70 Kda protein	102	43,697	3	gi 763157

De plus, des travaux antérieurs réalisés dans des lignées cellulaires gonadiques incluant la lignée de Sertoli par notre laboratoire (Mazaud Guittot et al., 2007) avaient identifié et confirmé par retard sur gel les facteurs ubiquitaires USF1/2 comme partenaires de liaison du motif Ebox du promoteur proximal de *Gata4 in vitro*. Malgré de longs mois de travail, mes essais avec les extraits nucléaires de cellules de Sertoli n'ont pas fournis les résultats espérés. Autant pour les facteurs USF (~ 42-44 KDa chez la souris) que pour d'autres bandes présentes avec l'oligo Ebox intact, nous n'avons pu isoler des bandes de signal moins intense ou absentes en présence de l'oligo Ebox muté (figure 3.11). Le profil des bandes était donc similaire dans les conditions d'oligo Ebox intact et muté.

Tableau 3.3 Analyse spectrométrique des bandes éluées à partir d'extraits d'ovaire adulte après digestion trypsique

Protéine proposée	Score	Poids moléculaire suggéré (KDa)	Peptides tryptiques	N° d'accension
Bande 1 sur gel (60 KDa)				
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	474	27,371	8	gi 61888838
Keratin 2 epidermis	316	71,447	5	gi 398168
Unnamed protein product	259	66,099	4	gi 12859782
Heat shock protein HSP27	246	22,944	6	gi 424143
Bande 2 sur gel (30 KDa)				
Unnamed protein product	77	30,107	1	gi 12843914
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	82	36,072	2	gi 6679937
Estradiol 17- β -dehydrogenase 11	143	33,145	2	gi 16716597
Bande 3 sur gel (25 KDa)				
X-ray repair cross-complementing protein 6	922	69,727	22	gi 145587104
Heat shock-related 70 kDa protein 2	649	69,983	12	gi 123621
zona pellucida sperm-binding protein 3	161	47,187	4	gi 6756083



Figure 3.11 Isolation et identification des facteurs liant le motif Ebox du promoteur 1a de *Gata4* dans les cellules de Sertoli

II- Caractérisation du rôle des sites de phosphorylation S105 et S261 sur la fonction de la protéine GATA4 chez la souris

A- Génération et caractérisation de la lignée *Gata4*^{S105A}

L'importance de la phosphorylation de la sérine S105 de GATA4 pour son activité a été rapportée *in vitro* dans des cardiomyocytes (Liang *et al.*, 2001). Tout récemment, la génération et la caractérisation de souris *Gata4*^{S105A} dont les allèles expriment une mutation de ce résidu ont confirmé un rôle critique de la sérine 105 pour l'activité de GATA4 au niveau du coeur (Van Berlo *et al.*, 2011). Cependant, l'importance de la sérine S105 n'a pas encore été adressée dans la fonction gonadique de GATA4. Pour approfondir nos connaissances à ce sujet, nous avons au début du projet entrepris de générer nous même une lignée murine *Gata4*^{S105A} en remplaçant le résidu sérine S105 par une alanine, empêchant ainsi la phosphorylation de GATA4 à ce site. Pour générer la lignée *Gata4*^{S105A}, notre stratégie était basée sur la technique de ciblage génétique qui avait consisté à remplacer la production de la protéine GATA4 endogène par la protéine mutante GATA4S105A via la recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires. La conversion de la sérine en alanine empêche la phosphorylation de GATA4 sur ce résidu. L'insertion d'une cassette de sélection néomycine dans notre construction nous avait permis de sélectionner des clones dont nous avons débuté la vérification de l'intégrité du génome par Southern blot avant leur micro-injection dans des blastocystes de souris pour générer des souris chimères. C'est pendant cette étape du projet qu'un article impliquant directement la lignée *Gata4*^{S105A} dans le coeur a été publié (Van Berlo *et al.*, 2011). Nous n'avons donc pas poursuivi la génération de la lignée considérant l'accès immédiat à ces souris.

3.7 Les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} se reproduisent normalement

Les souris *Gata4*^{S105A} ont été générées par Van Berlo (laboratoire du Dr Molkentin/Cincinnati) dans un contexte de vouloir connaître le rôle de la sérine S105 dans la fonction de GATA4 au niveau cardiaque. Bien que ce groupe n'ait rapporté aucun

effet évident de la mutation sur la capacité reproductive des souris, nous avons demandé ces souris afin de faire une analyse plus approfondie d'un phénotype potentiel sur le système reproducteur. En accord avec Van Berlo et al. (van Berlo *et al.*, 2011), les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} étaient viables et fertiles, respectaient les rapports mendéliens et ne présentaient aucun problème reproducteur apparent. Nos tests de fertilité (tableau 3.4) réalisés en mettant en accouplement des couples de souris mutantes en comparaison avec des souris de type sauvage ont d'ailleurs confirmé leur fertilité puisque les taux d'accouplement, de gestation ainsi que le nombre de souriceaux par portée chez les mutantes étaient comparables à ceux des souris C57BL/6. De plus, le ratio total des souris mâle par rapport aux souris femelles sur le nombre total des naissances était identique chez les mutants, confirmant qu'il n'y avait aucune prédominance d'un sexe au détriment de l'autre dans les différentes portées (sur 5 générations).

3.8 La mutation S105A de GATA4 affecte la taille des gonades et des tissus reproducteurs accessoires

Bien que les souris *Gata4*^{S105A} homozygotes aient la capacité de se reproduire normalement, ce fait n'excluait pas la possibilité que la mutation S105A pouvait être associée à une diminution d'un paramètre reproducteur plus spécifique comme la production d'hormones ou le nombre de spermatozoïdes. En effet, ces derniers peuvent être affectés sans qu'il y ait un effet sur la capacité reproductive des souris.

Tableau 3.4 Tests de fertilité pour les souris *Gata4*^{S105A} homozygotes

Paramètres analysés	WT	Mutant
Taux d'accouplement *	66,6% (6/9)	77,7% (7/9)
Taux de gestation **	66,6% (4/6)	71,4% (5/7)
Nombre moyen de petits par portée	6	7,3

*Nombre de femelles présentant un bouchon vaginal par femelles en croisement

**Nombre de femelles gestantes sur le nombre de femelles ayant présenté un bouchon vaginal

RATIO MÂLE/FEMELLE

- C57BL/6 (type sauvage) = 27 mâles : 27 femelles
- *Gata4*^{S105A} = 33 mâles : 33 femelles

Nous avons commencé notre analyse approfondie sur les souris mâles. Un indicateur simple du bon fonctionnement du système reproducteur mâle est le poids des organes génitaux mâles internes et externes qui dépendent du niveau circulant d'androgènes. Les gonades et les glandes accessoires (vésicules séminales, prostates et épидидymes) de souris mâles adultes (âgées de 3 mois) ont été collectées et pesées à l'aide d'une balance analytique. De façon intéressante, la taille des testicules des homozygotes *Gata4*^{S105A} normalisée par rapport à la masse corporelle était significativement plus élevée (figure 3.12C) tandis que le poids des organes androgéno-sensibles (vésicules séminales, épидидyme et prostate) montrait une tendance à la baisse (figure 3.12B, D, E). La diminution du poids de la prostate était très significative (Figure 3.12D) suggérant ainsi une exposition réduite aux androgènes ou alors à une action limitée des androgènes

chez les mâles adultes *Gata4*^{S105A}. De la même façon, les ovaires des souris homozygotes *Gata4*^{S105A} ont affiché un poids significativement réduit par rapport aux ovaires de souris de type sauvage (tableau 3.5).

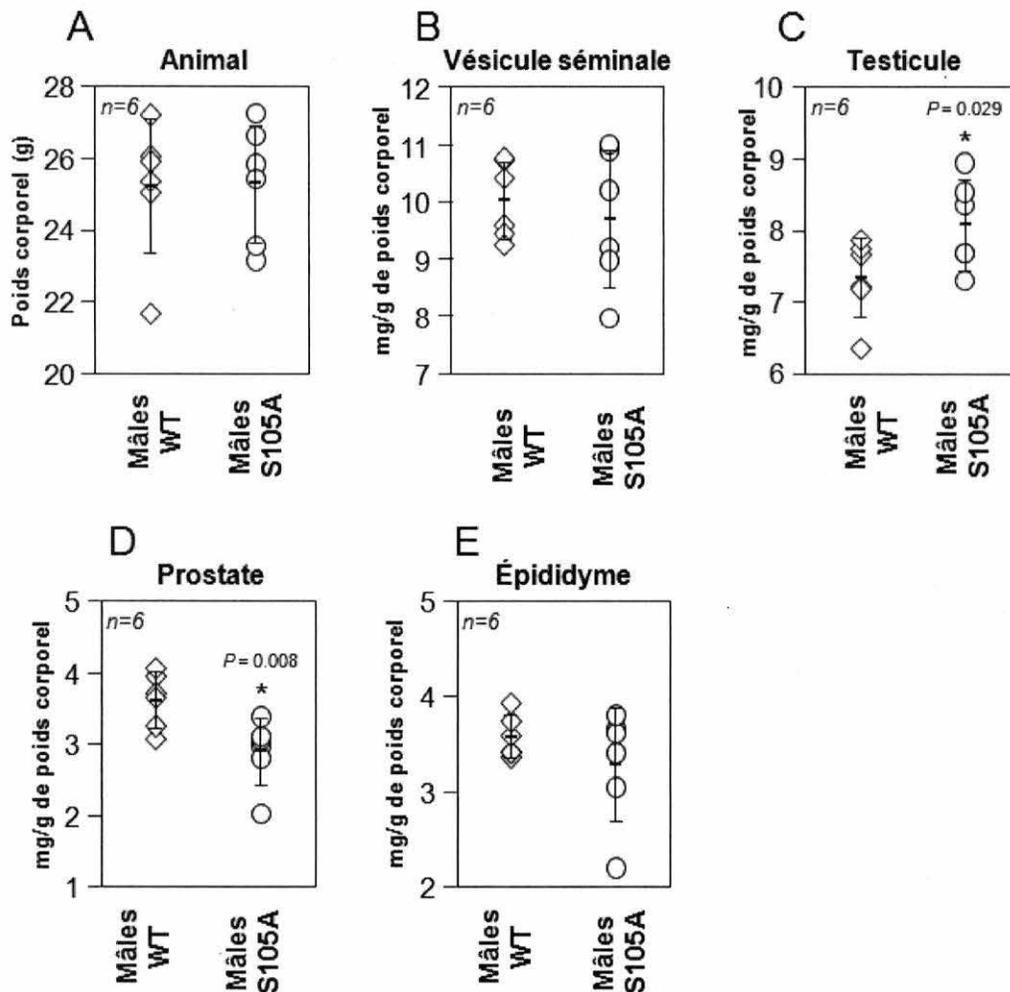


Figure 3.12 La mutation GATA4 S105A provoque une altération du poids de plusieurs organes du système reproducteur masculin

Le poids corporel ainsi que le poids de plusieurs organes du tractus reproducteur mâle des souris de type sauvage (WT) et *Gata4*^{S105A} ont été étudiés. Poids corporel (A), vésicule séminale (B), testicules (C), prostate (D), épидидyme (E). Pour les tissus reproducteurs mâles, les résultats sont rapportés en tant que rapport du poids de l'organe par rapport au poids corporel (en mg/g de poids corporel). Six animaux de chaque génotype (WT ou S105A) ont été analysés. $P < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative en utilisant un t-test unilatéral.

Tableau 3.5 Comparaison du poids des ovaires entre les souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S105A}

	Poids ovaires WT	Poids ovaires <i>Gata4</i> ^{S105A}
1	25	17
2	22	18
3	24	20
4	25,7	17,5
5	23,4	14,7
6	19,5	11,2
Moyenne	23,26 ± 2,24	16,40 ± 3,06

Six souris femelles adultes de chaque génotype (WT ou *Gata4*^{S105A} homozygotes) ont été analysées. P-value = 0,0006. P < 0,05 a été considérée comme statistiquement significative en utilisant un t-test unilatéral.

3.9 Les niveaux sériques des hormones testostérone et LH sont altérés chez les souris mâles *Gata4*^{S105A} homozygotes

Il est bien connu que le développement et la fonction des tissus reproducteurs mâles sont fortement sous la dépendance des androgènes pendant la période fœtale et de la puberté jusqu'à l'âge adulte. La testostérone produite par les cellules de Leydig au niveau du testicule, est le principal androgène circulant. Chez un animal adulte, le taux de testostérone dans le sérum est principalement régulé suivant l'axe hypothalamo-hypophysaire par l'action de la LH sur les cellules de Leydig. Les changements dans les poids des organes du tractus reproducteur mâle observés chez les souris *Gata4*^{S105A}, nous ont poussés à évaluer par ELISA les niveaux sériques de testostérone et de la LH. Tel que

présenté à la figure 3.13A, les souris *Gata4*^{S105A} montraient une diminution significative de près de 80% du niveau de testostérone sérique. Le niveau de la LH chez ces mêmes animaux démontrait une tendance à la hausse (Figure 3.13B).

3.10 La mutation GATA4 S105A de GATA4 n'affecte pas la morphologie des gonades

La mutation S105A affecte la taille des testicules et entraîne une réduction drastique du taux de testostérone chez les souris *Gata4*^{S105A}. Pour vérifier si la mutation S105A affecte également la morphologie des gonades au cours du développement, nous avons procédé à l'analyse histologique des coupes de testicules et d'ovaires à partir de souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S105A} au stade embryonnaire, prépubère et adulte.

Au stade fœtal l'organisation du testicule est marquée par l'apparition des cordons testiculaires entrecoupés de cellules de Leydig (figure 3.14A). L'événement majeur au cours de la période fœtale est la différenciation des cellules de Sertoli, une fonction régulée par GATA4. L'apparence histologique du testicule à ce stade était similaire dans les souris de type sauvage et les souris homozygotes *Gata4*^{S105A}. Au stade prépubère, l'apparence histologique des testicules semble normale (figure 3.14C) et est similaire à celle observée dans les testicules des souris *Gata4*^{S105A} (figure 3.14D). Au stade adulte, les testicules présentent une apparence histologique conforme de ce stade puisqu'on distingue nettement les cellules de Sertoli et de Leydig où s'exprime principalement GATA4 (figure 3.14E). La mutation S105A n'a aucune incidence sur l'apparence histologique du testicule adulte chez les souris *Gata4*^{S105A} (figure 3.14F).

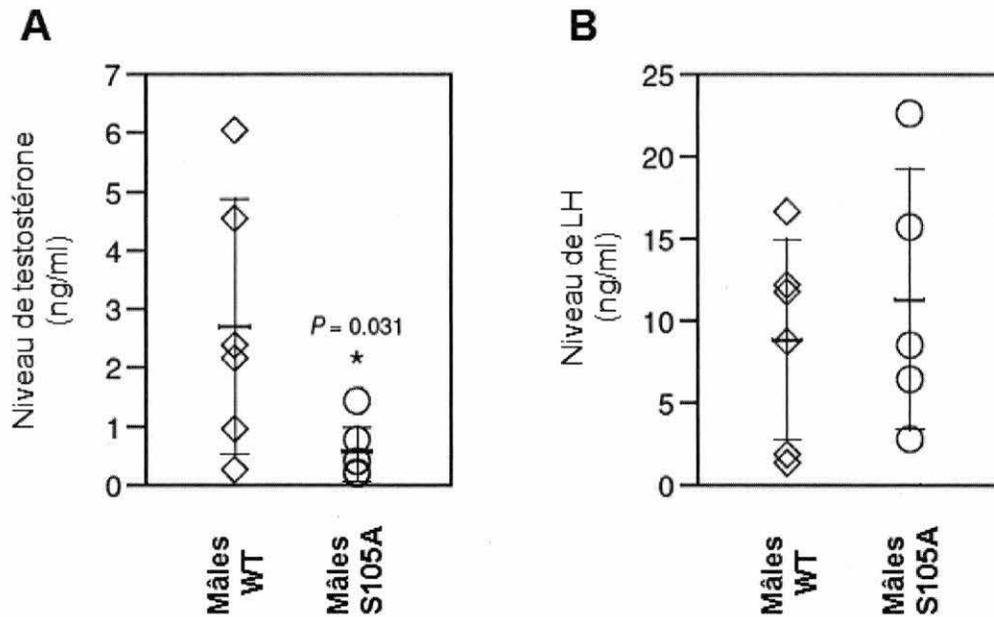


Figure 3.13 La mutation GATA4 S105A affecte le niveau circulant des hormones testostérone et LH chez les souris *Gata4*^{S105A} homozygotes

Des tests ELISA ont été utilisés pour quantifier les niveaux de testostérone (A) et de la LH (B) sérique dans les souris de type sauvage (WT) et les mâles *Gata4*^{S105A}. Au total, six (6) animaux de chaque génotype ont été analysés. Les niveaux de testostérone chez les mâles homozygotes *Gata4*^{S105A} étaient en moyenne 80% moins élevés que chez les mâles de type sauvage. $P < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative en utilisant un test unilatéral. Dans l'ensemble, le niveau de la LH chez les mâles *Gata4*^{S105A} montrait une tendance à la hausse (en moyenne 20% plus élevé que chez les mâles WT) mais la différence n'était pas statistiquement significative ($P > 0,05$).

Dans l'ovaire fœtal des souris de type sauvage (figure 3.15A), la formation des cordons ovigères s'achève pendant que les cellules germinales rentrent en méiose. La mutation S105A n'a aucun impact sur l'apparence histologique des ovaires chez les souris *Gata4*^{S105A} (figure 3.15B). Au stade prépubère, les cellules somatiques (cellules de la granulosa et de la thèque) exprimant GATA4 sont clairement visibles alors qu'apparaissent les follicules primaires contenant les ovocytes (figure 3.15C). Les ovaires des souris *Gata4*^{S105A} présentent le même profil histologique (figure 3.15D) à ce stade. Au stade adulte chez les souris de type sauvage (figure 3.15E), l'expression de GATA4 persiste dans les cellules somatiques incluant les cellules lutéales. La morphologie des cellules est d'apparence normale et est marquée par la présence de follicules à différents stades de développement. Encore une fois, le profil histologique demeure inchangé dans les ovaires des souris *Gata4*^{S105A} (figure 3.15F). Il apparaît clairement que la mutation GATA4 S105A n'affecte pas l'histologie des gonades des souris homozygotes *Gata4*^{S105A} peu importe le stade de développement examiné.

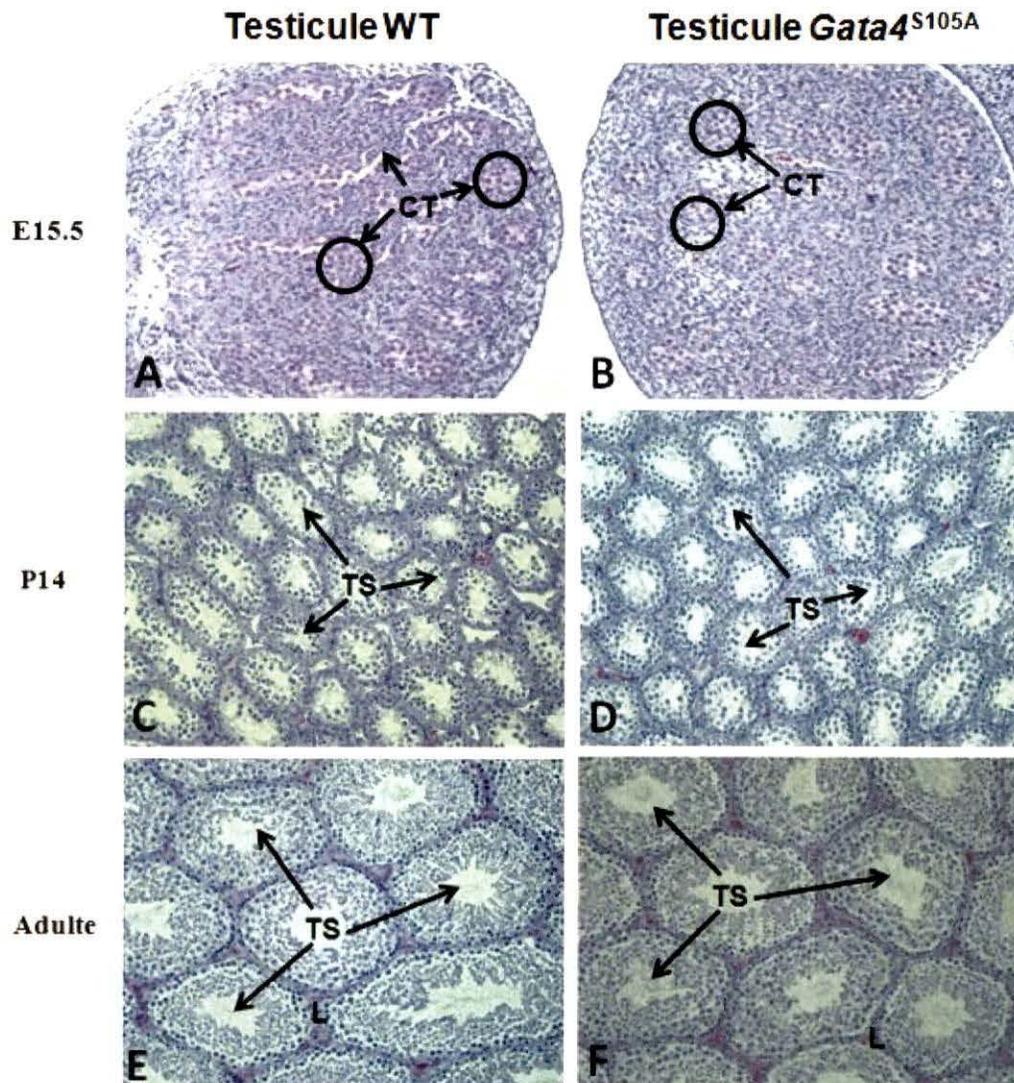


Figure 3.14 La mutation S105A n'affecte pas la morphologie des testicules des souris *Gata4*^{S105A} homozygotes

Des sections transversales de testicules obtenus de souris de type sauvage (A, C et E) et de souris homozygotes *Gata4*^{S105A} (B, D et F) colorées à l'hématoxyline-éosine ont été analysées au stade embryonnaire, prépubère et adulte. Les images ont été prises à un grossissement de 100x. CT, cordon testiculaire ; TS, tube séminifère ; L, cellules de Leydig.

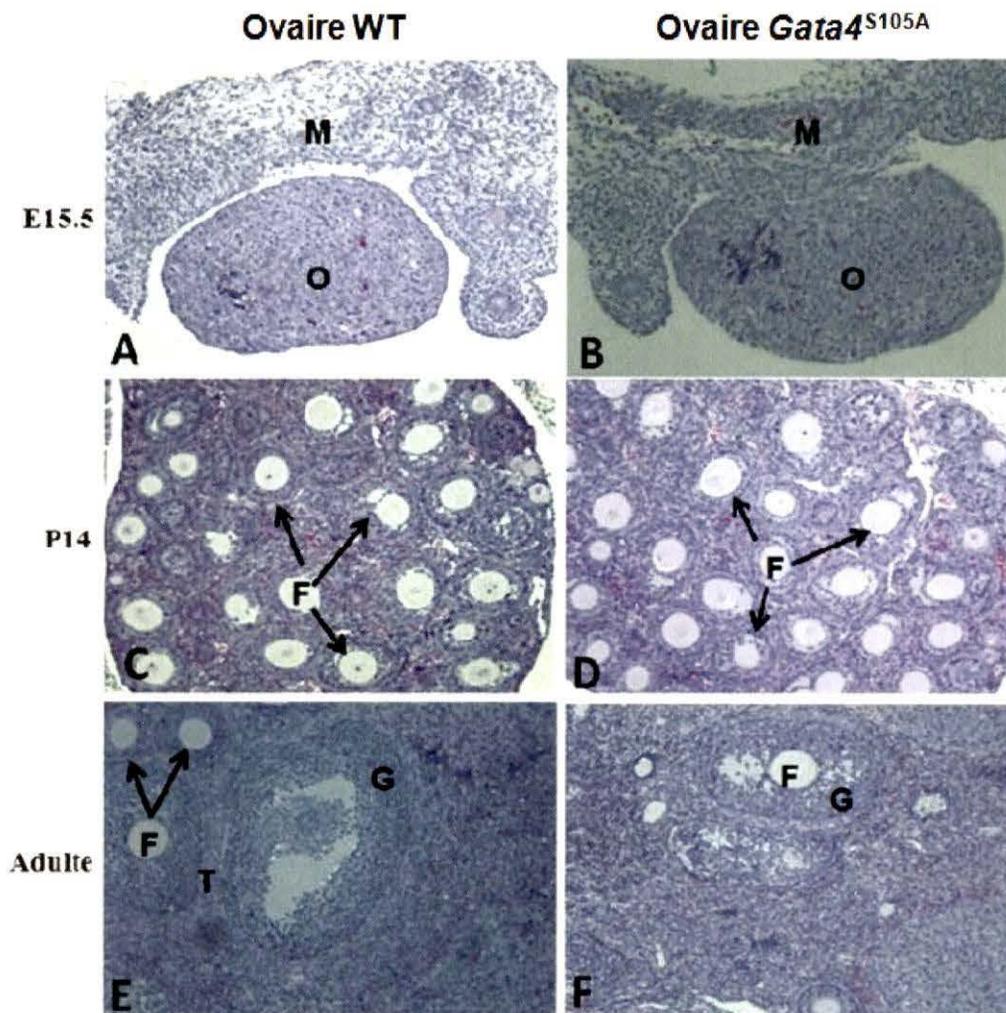


Figure 3.15 La mutation S105A n'affecte pas la morphologie des ovaires des souris *Gata4*^{S105A} homozygotes

Des sections transversales d'ovaires obtenus à partir de souris de type sauvage (A, C et E) et de souris homozygotes *Gata4*^{S105A} (B, D et F) colorées à l'hématoxyline-éosine ont été analysées au stade embryonnaire, prépubère et adulte. Les images ont été prises à un grossissement de 100x. O, ovaire ; M, mésonéphros ; F, follicule. G, cellules de la granulosa ; T, cellules de la thèque.

3.11 La mutation GATA4 S105 affecte l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie stéroïdogénique du testicule

La stéroïdogénese est un processus essentiel dans le fonctionnement gonadique. Elle mène à la synthèse de la testostéone à partir du cholestérol. La voie stéroïdogénique est contrôlée par plusieurs gènes clés dont certains sont de surcroît des cibles de GATA4. La diminution drastique des niveaux de testostéone causée par la mutation GATA4 S105A nous a amené à analyser par PCR quantitative l'expression des gènes stéroïdogéniques qui sont de surcroît utilisés comme marqueurs de fertilité. Tel qu'indiqué sur la figure 3.16, la majorité des gènes analysés codent pour des enzymes stéroïdogéniques intervenant à différentes étapes de la conversion du cholestérol en testostéone, à l'exception de StAR (steroidogenic acute regulatory protein) qui code pour une protéine qui participe au transport du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie où se déroule la synthèse de testostéone dans les cellules de Leydig.

Les niveaux d'expression de *Gata4*, comme attendu, demeurent inchangés (figure 3.17A). De façon intéressante, l'expression des transcrits du gène *Star* montre une réduction significative de 40% chez les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} (figure 3.17B). L'expression des transcrits du gène *Cyp11a1*, codant pour l'enzyme qui catalyse la première réaction de synthèse de prégnénolone à partir du cholestérol est réduite de 43% chez les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} (figure 3.17C). La même tendance est observée avec les gènes codants pour la 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase de type 1 et la 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase de type 3 dont la mutation GATA4 S105A entraîne une diminution significative de 36 et 41% respectivement (figure 3.17D, E).

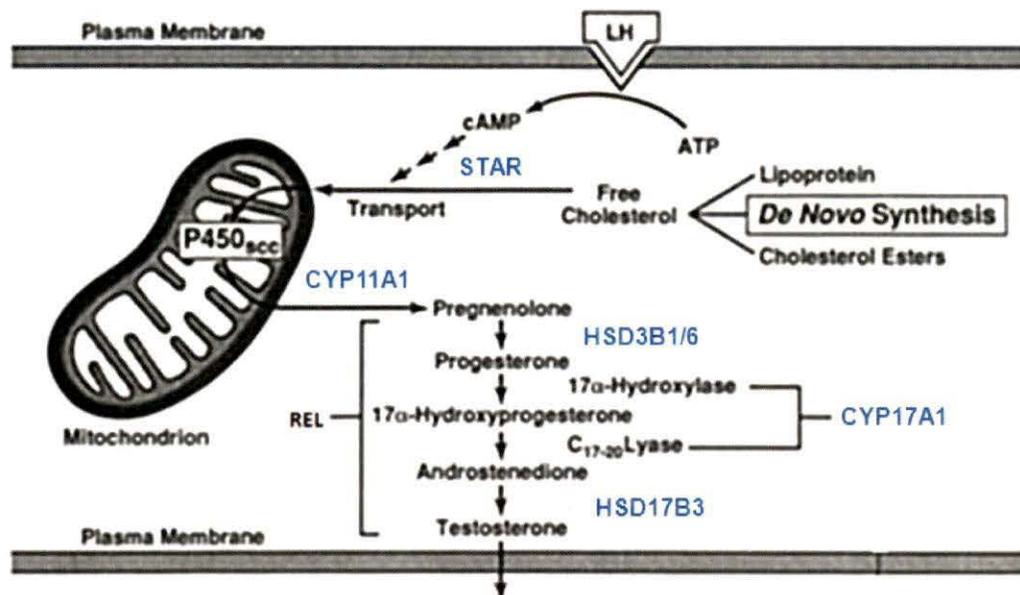


Figure 3.16 Schéma illustrant l'ordre des différentes enzymes de la voie stéroïdogénique dans les testicules

Dans les cellules de Leydig, la LH ou l'AMPc stimule la production de testostérone à partir du cholestérol qui est transportée dans la mitochondrie par la protéine STAR. S'ensuit une cascade enzymatique faisant intervenir respectivement le cytochrome P450 sc (CYP11A1), la 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase de types 1 et 6 (HSD3B1/6), la 17α-hydroxylase (CYP17A1) ainsi que la 17β-hydroxystéroïde déhydrogénase de type 3 (HSD17B3) pour la conversion du cholestérol en testostérone. REL, réticulum endoplasmique lisse. Adapté de Payne et Youngblood (1995).

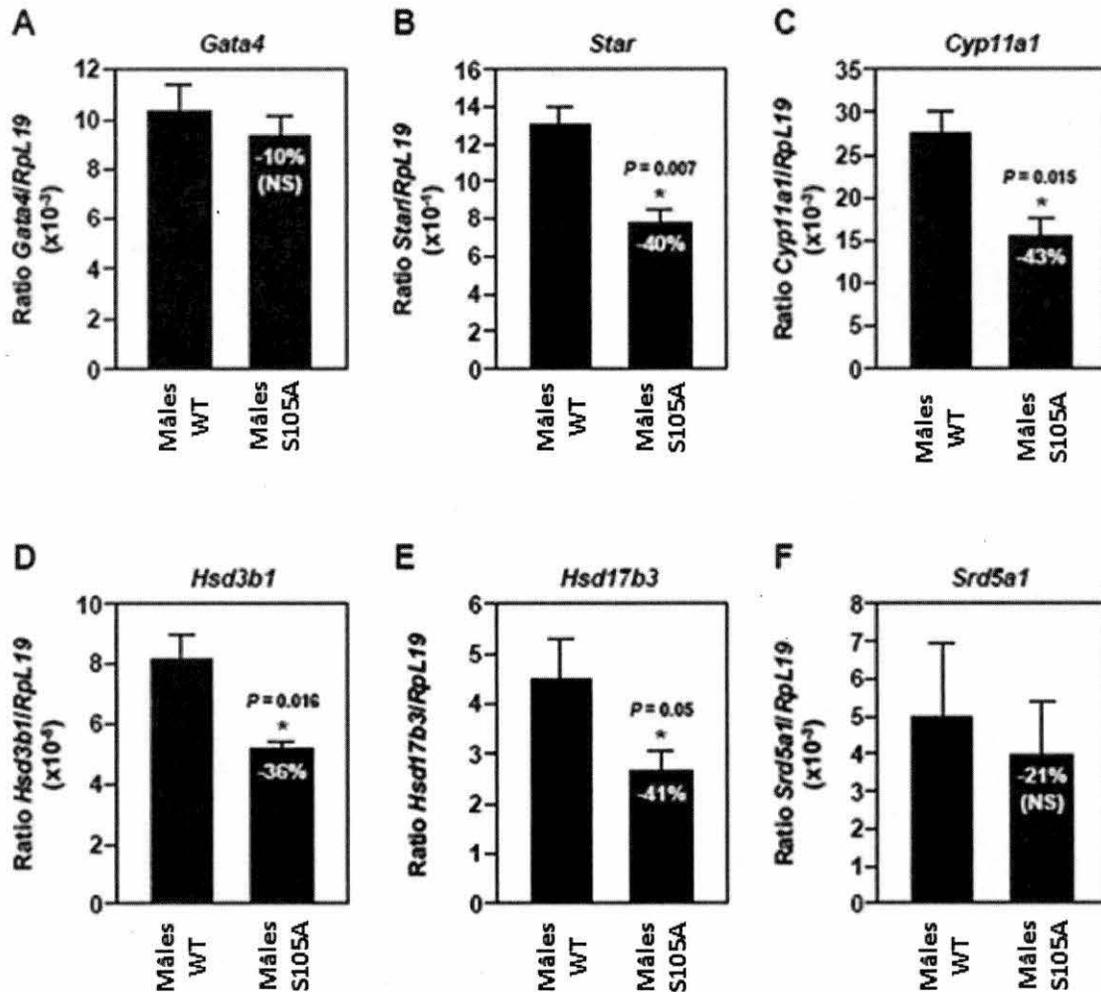


Figure 3.17 La mutation GATA4 S105A conduit à une baisse de l'expression de gènes impliqués dans la voie stéroïdogénique dans les testicules

Les niveaux d'ARNm de *Gata4* (A), *Star* (B), *Cyp11a1* (C), *Hsd3b1* (D), *Hsd17b3* (E) et *Srd5a1* (F) dans les testicules adultes de souris de type sauvage (WT) et homozygotes *Gata4*^{S105A} ont été évalués par PCR quantitative. Les données sont rapportées en tant que rapport entre le niveau du transcrite d'intérêt à celui du gène de référence *Rpl19* pour trois animaux indépendants (n=3). Les astérisques indiquent des différences significatives entre les souris WT et homozygotes *Gata4*^{S105A} (P < 0,05 par le test-t de Student). NS, non significatif.

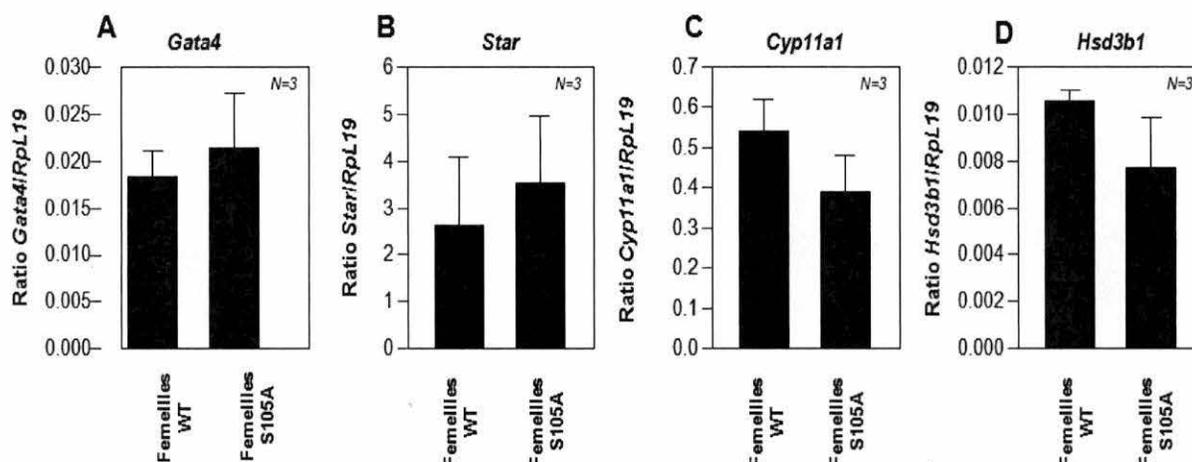


Figure 3.18 Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la voie stéroïdogénique dans les ovaires de souris homozygotes *Gata4*^{S105A} au stade adulte

Les niveaux d'ARNm de *Gata4* (A), *Star* (B), *Cyp11a1* (C) et *Hsd3b1* (D) dans les ovaires adultes de souris de type sauvage (WT) et homozygotes *Gata4*^{S105A} ont été évalués par PCR quantitative. Les données sont rapportées en tant que rapport entre le niveau du transcrit d'intérêt à celui du gène de référence *Rpl19* pour trois animaux indépendants (n=3).

Nous avons également évalué l'expression de la 5-alpha réductase (*Srd5a1*) qui est un marqueur des cellules de Leydig adultes de type immatures qui ne sont présentes que pour une courte période juste avant la puberté et sécrètent principalement la dihydrotestostérone (DHT). Il existait donc une possibilité que la diminution du niveau de testostérone soit reliée à un blocage des cellules de Leydig au stade immature. Si tel était le cas, nous nous attendions à une augmentation de l'expression du marqueur *Srd5a1*. Mais cela ne semble pas être le cas puisque l'expression de *Srd5a1* chez les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} était comparable à l'expression observée dans les testicules de souris de type sauvage (figure 3.17F).

Pour vérifier si la diminution significative du poids des ovaires observé chez les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} (tableau 3.5) avait une incidence sur l'expression des transcrits des gènes stéroïdogéniques, nous avons réalisé la même analyse chez les

femelles adultes. Les résultats de PCR quantitative ne montraient ni une diminution ni une augmentation significative des marqueurs analysés (figure 3.18). Nous avons par la suite réalisé que nous devrions tenir compte du cycle oestral de chaque souris pour effectuer ces analyses puisque les niveaux d'expression de ces marqueurs de fertilité fluctuent selon la variation des hormones stéroïdiennes au cours des phases du cycle oestral (proestrus, estrus, metestrus et diestrus). La poursuite de cette partie du projet aurait nécessité une formation spécifique que je ne possédais pas et aussi du temps supplémentaire. C'est pour ces raisons que nous avons décidé de compléter notre étude en se focalisant uniquement sur les souris mâles homozygotes *Gata4*^{S105A} adultes.

3.12 La réduction de l'expression de plusieurs gènes stéroïdogéniques induite par la mutation GATA4 S105A est associée à une diminution du niveau des protéines correspondantes

Comme l'expression de plusieurs gènes stéroïdogéniques est significativement régulée à la baisse dans les testicules, et en considérant que des changements au niveau des ARNs messagers ne sont pas toujours étendus au niveau de la protéine, il était donc important d'analyser l'expression des protéines correspondantes dans les testicules aux stades embryonnaire (E15,5), prépubère (P14) et adulte (3 mois). Pour parvenir à cette fin, nous avons réalisé des immuno-histochimies sur des sections paraffinées de testicules de souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S105A}. Au stade foetal, chez les souris de type sauvage, GATA4 marque les cellules somatiques (figure 3.19B). Au stade prépubère, la protéine GATA4 chez les souris de type sauvage, est toujours très présente dans les noyaux des cellules de Sertoli en périphérie des tubules séminifères, des cellules de Leydig entre les tubules et les cellules périlitubulaires qui tapissent la périphérie des tubules séminifères (figure 3.20B). Au stade adulte chez les souris de type sauvage, la présence de la protéine GATA4 est maintenue dans les noyaux des cellules de Sertoli, de Leydig et périlitubulaires (figure 3.21B). Comme attendu, le profil de GATA4 dans les testicules des souris homozygotes *Gata4*^{S105A} demeure similaire à celui des souris de type sauvage au stade embryonnaire, prépubère et adulte (figure 3.19B, 3.20B et 3.21B). Les

protéines STAR, CYP11A1, CYP17A1 et 3 β HSD marquent les cellules de Leydig dans l'espace entre les cordons testiculaires des souris de type sauvage au stade fœtal (figure 3.19C, D, E et F). Au stade prépubère, les mêmes protéines marquent les cellules de Leydig (figure 3.20C, D, E et F). Le profil de ces différents marqueurs stéroïdogéniques demeure similaire chez les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} aux deux stades évoqués.

En revanche, le fait intéressant de cette analyse a eu lieu au stade adulte marqué par un impact de la mutation GATA4 S105A sur les protéines stéroïdogéniques. En effet, dans les testicules adultes des souris homozygotes *Gata4*^{S105A}, de façon spectaculaire et conformément aux données de PCR quantitative, les niveaux de la protéine de transport STAR ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse de la testostérone semble diminuée dans les cellules de Leydig (figure 3.21C, D, E, F et G), diminutions qui corrént justement avec la baisse du niveau de testostérone.

Nous avons également procédé à l'analyse par immuno-histochimie de l'expression de deux marqueurs de cellules de Leydig adultes. L'expression du marqueur de cellules de Leydig adultes de type immature SRD5A1 (5alpha-réductase) n'était pas affectée par la mutation (figure 3.22B) confirmant les résultats de PCR quantitative (figure 3.17F). Le résultat était le même pour INSL3 (figure 3.22C), marqueur de cellules de Leydig différenciées et utilisée comme témoin de leur intégrité, dont l'expression dans les testicules des souris homozygotes *Gata4*^{S105A} est comparable au type sauvage.

3.13 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas la production de spermatozoïdes

Nos résultats ont montré que la mutation GATA4 S105A entraîne une baisse du niveau de testostérone sérique chez les souris homozygotes *Gata4*^{S105A}. Or il est connu que la testostérone en concert avec la FSH, est nécessaire pour initier et maintenir la production de spermatozoïdes. Afin de vérifier si la baisse du niveau de testostérone observé chez les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} s'accompagne d'une diminution du nombre de spermatozoïdes, nous avons procédé à un décompte spermatique. Pour ce faire, des spermatozoïdes ont été prélevés à partir de l'épididyme des souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S105A} adultes puis fixés au paraformaldéhyde. Nous avons

déecté en moyenne $7,37 \times 10^6$ spermatozoïdes/mL dans les testicules de souris de type sauvage contre $6,72 \times 10^6$ spermatozoïdes/mL pour les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} (tableau 3.6). Les résultats n'ont pas montré de différence significative dans la quantité de spermatozoïdes chez les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} comparativement au type sauvage, confirmant ainsi que la mutation GATA4 S105A n'a pas d'effet sur la spermatogenèse. En considérant ce résultat, ajouté au fait que les souris homozygotes *Gata4*^{S105A} mâles étaient fertiles, nous n'avons plus jugé utile d'évaluer la morphogenèse des spermatozoïdes.

Tableau 3.6 Décompte spermatique réalisé à partir d'un morceau d'épididyme prélevé sur des souris de type sauvage et *Gata4*^{S105A} au stade adulte (N=3)

	C57BL/6 (WT)	<i>Gata4</i>^{S105A}
1	8,4x10 ⁶ /mL	7,8x10 ⁶ /mL
2	7,67x10 ⁶ /mL	6,4x10 ⁶ /mL
3	6,05x10 ⁶ /mL	5,97x10 ⁶ /mL
moyenne	7,37 x10 ⁶ /mL ± 1,2	6,72 x10 ⁶ /mL ± 0,95

Pour évaluer le nombre de spermatozoïde chez les souris de type sauvage et mutantes, trois décomptes indépendants ont été réalisés mais la différence n'était pas statistiquement significative ($P > 0,05$).

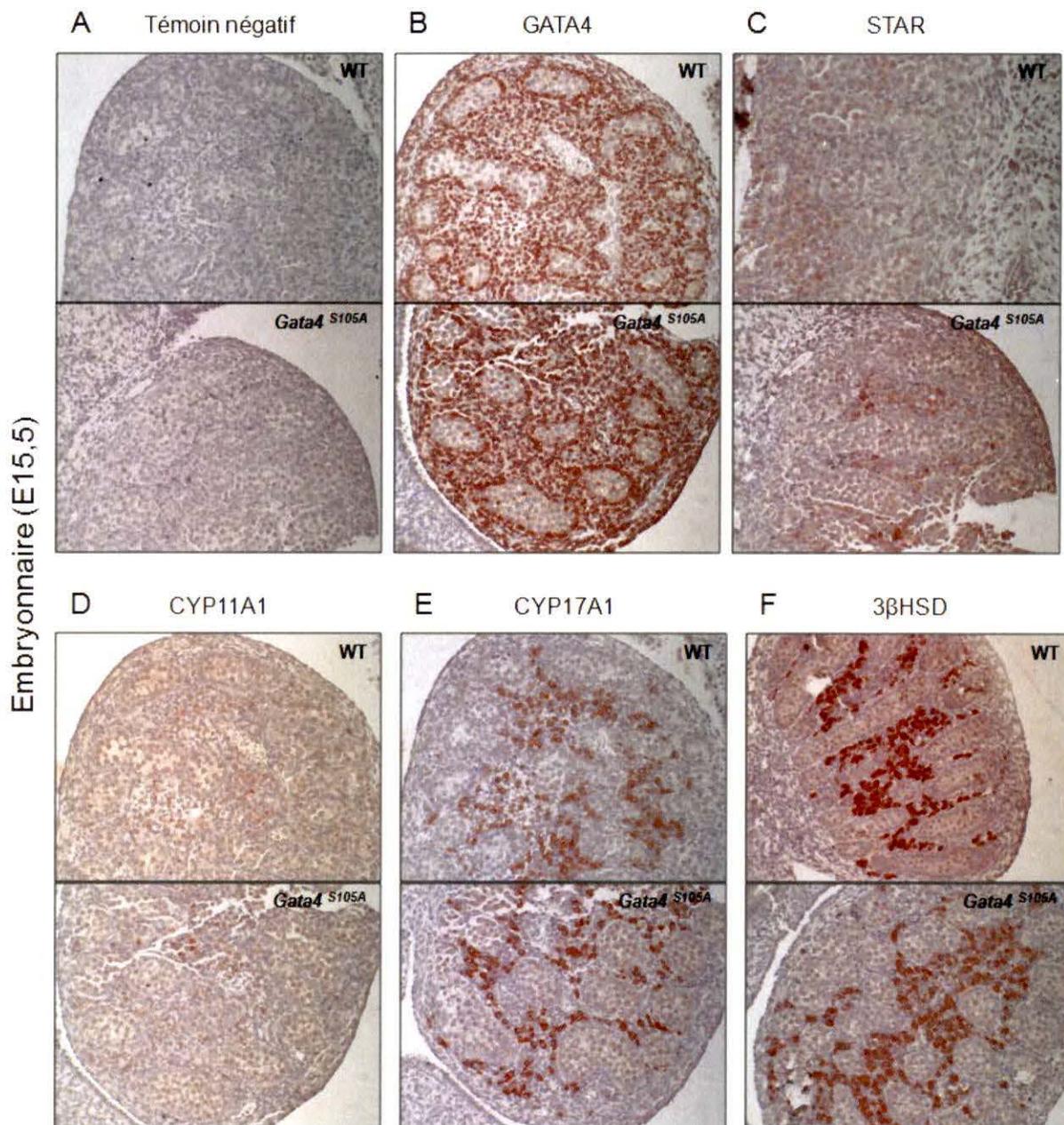


Figure 3.19 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas l'expression des marqueurs stéroïdogéniques dans les testicules des souris homozygotes *Gata4*^{S105A} au stade embryonnaire

La présence des protéines GATA4 (B), STAR (C), CYP11A1 (D), CYP17A1(E) et 3βHSD (F) a été évaluée par immuno-histochimie sur des coupes paraffinées de testicules de souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S105A} obtenues au stade embryonnaire (E15,5). (A): témoin négatif, sans anticorps primaire. Les images ont été prises à un grossissement de 200x et 400x respectivement.

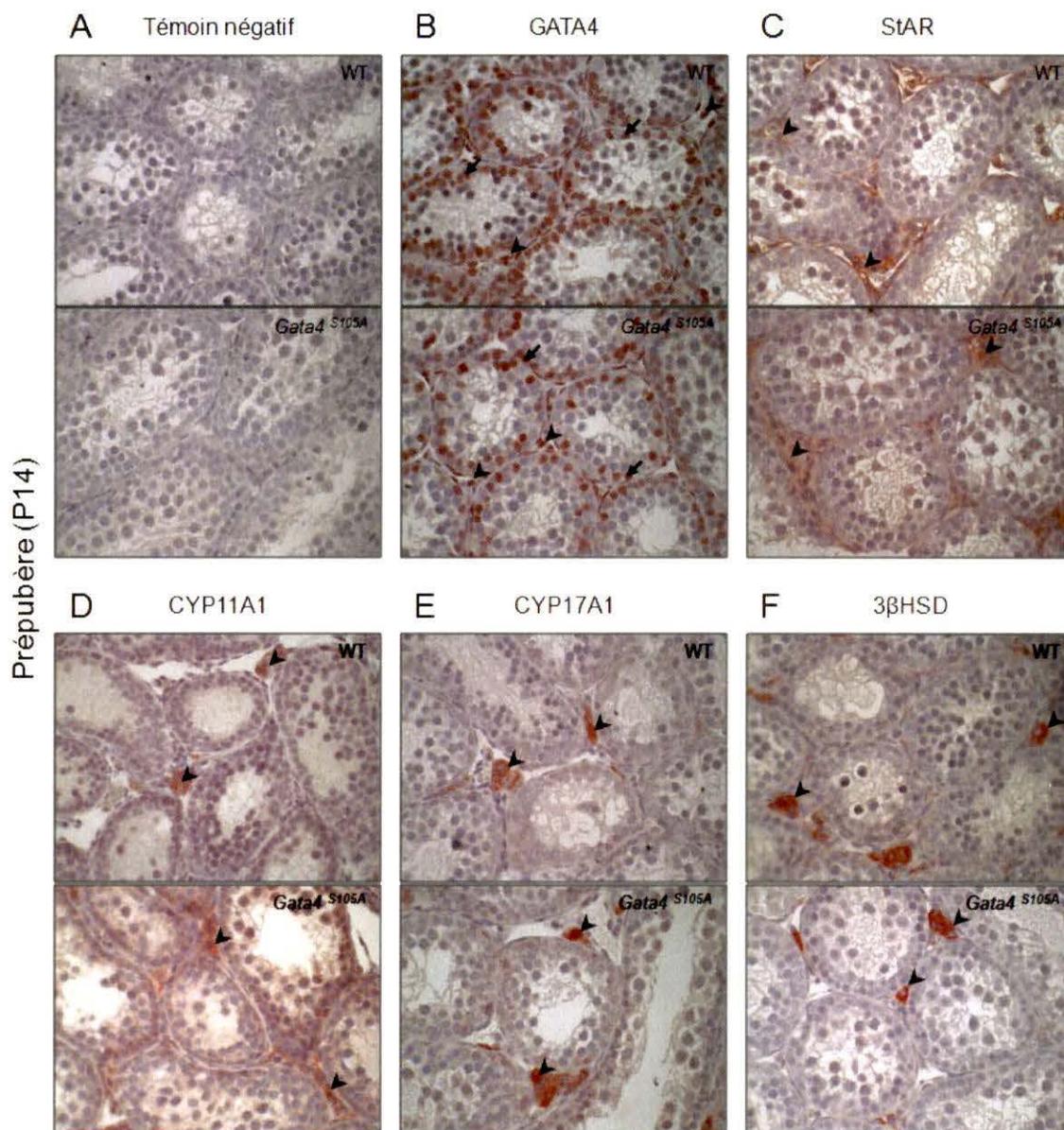
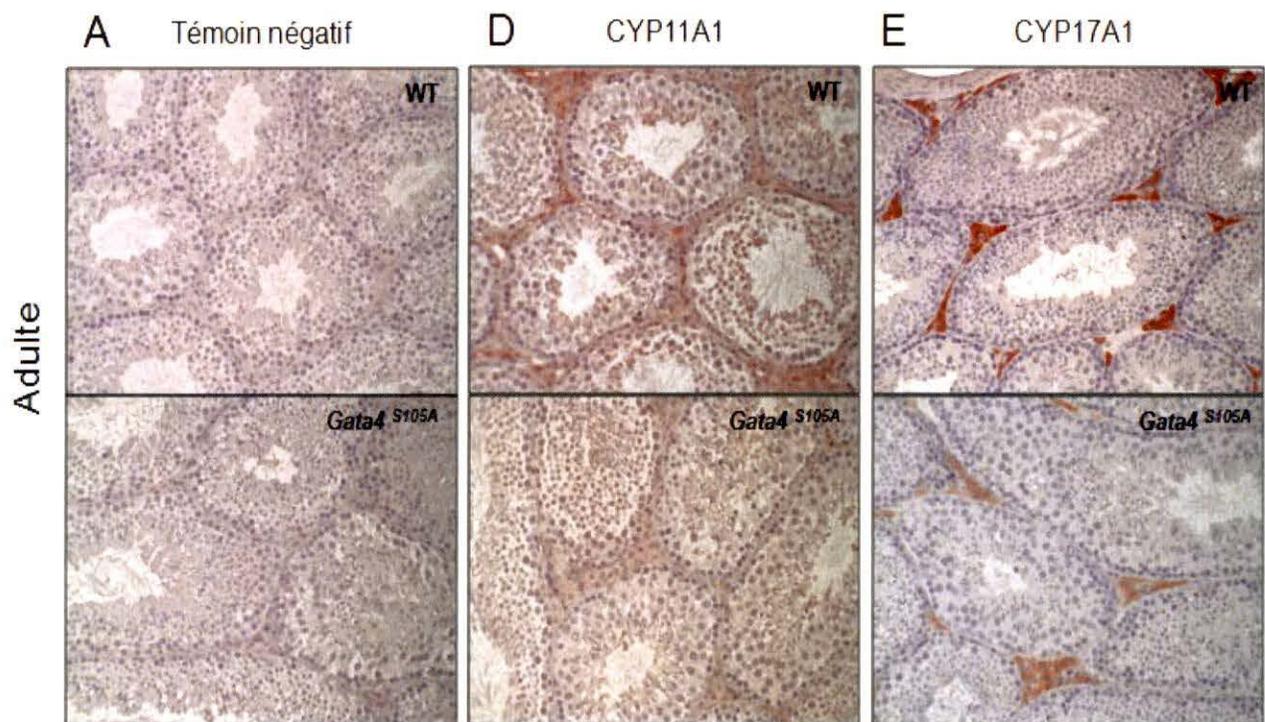
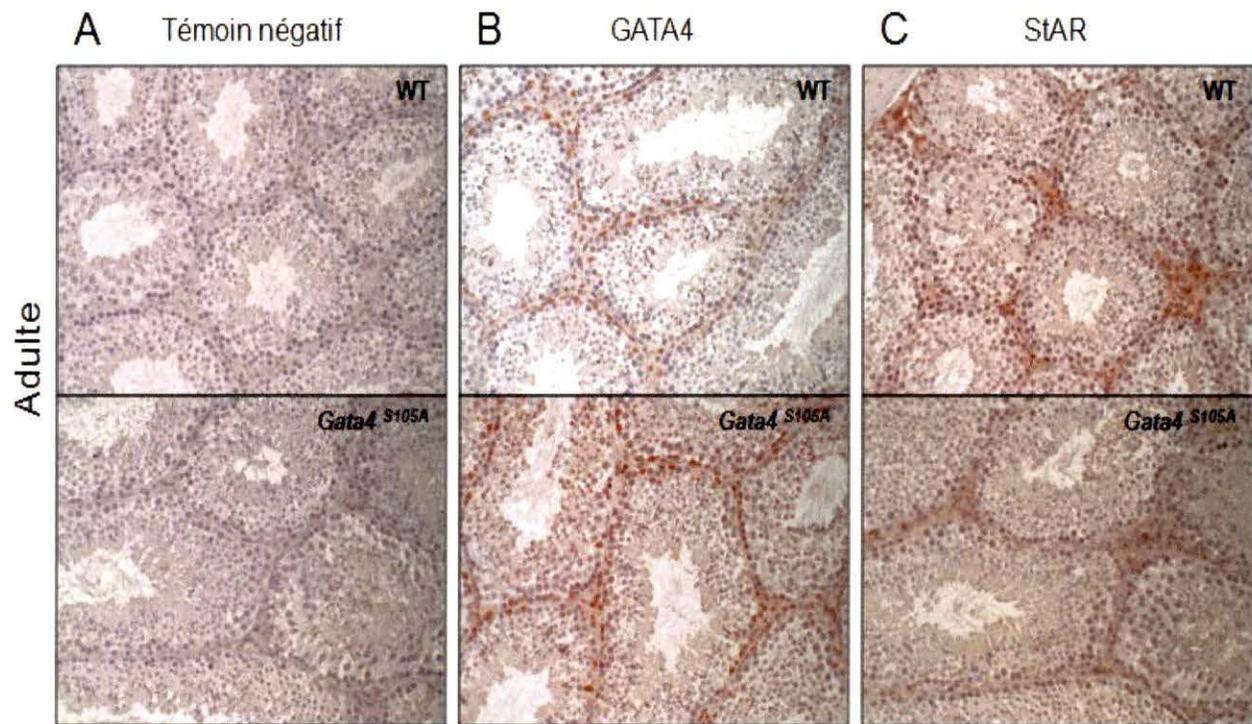


Figure 3.20 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas l'expression des marqueurs stéroïdogéniques dans les testicules des souris homozygotes *Gata4*^{S105A} au stade prépubère

La présence des protéines GATA4 (B), STAR (C), CYP11A1 (D), CYP17A1(E) et 3βHSD (F) a été évaluée par immuno-histochimie sur des coupes paraffinées de testicules de souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S105A} obtenues au stade prépubère (P14). (A): témoin négatif, sans anticorps primaire. Flèches: marquage dans les cellules de Sertoli; Pointes de flèches: marquage dans les cellules de Leydig. Les images ont été prises à un grossissement de 200x et 400x respectivement.



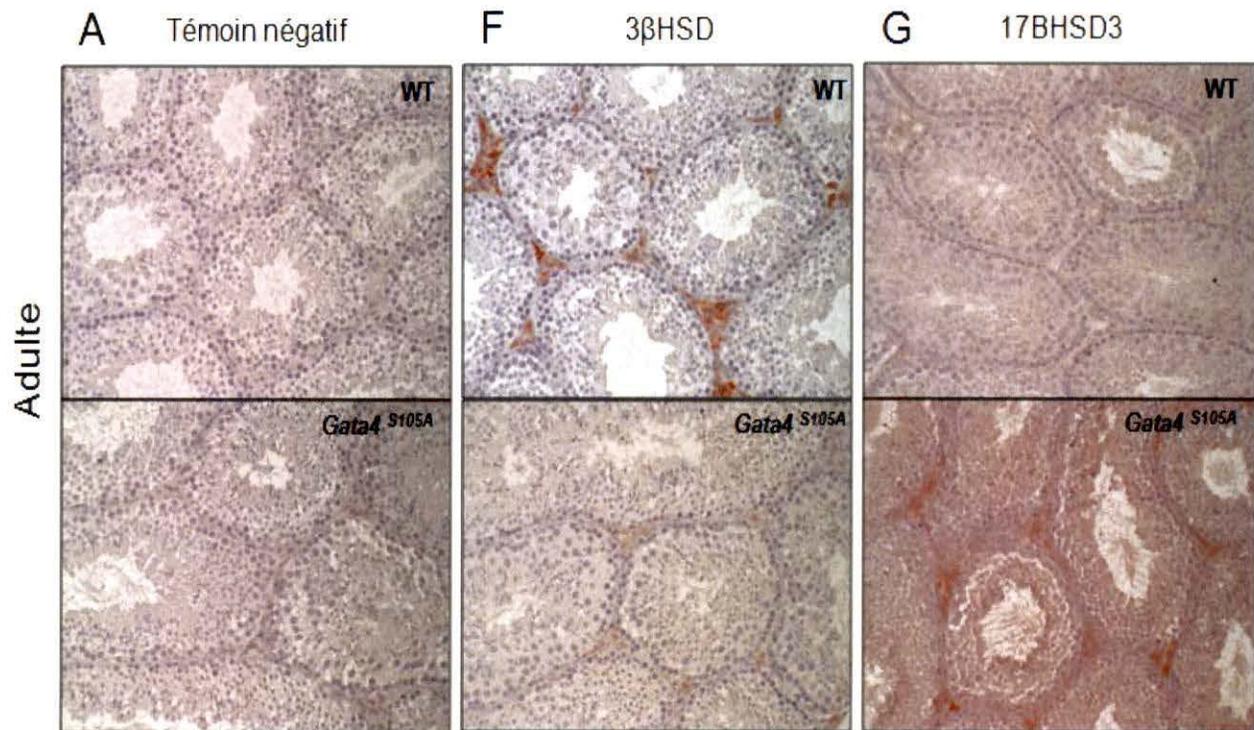


Figure 3.21 La mutation GATA4 S105A affecte l'expression des marqueurs stéroïdogéniques dans les testicules des souris homozygotes *Gata4*^{S105A} au stade adulte

La présence des protéines GATA4 (B), StAR (C), CYP11A1 (D), CYP17A1 (E), 3 β HSD (F) et 17 β HSD3 (G) a été évaluée par immuno-histochimie sur des coupes paraffinées de testicules de souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S105A} obtenues au stade adulte. (A): témoin négatif, sans anticorps primaire. Les images ont été prises à un grossissement de 200x.

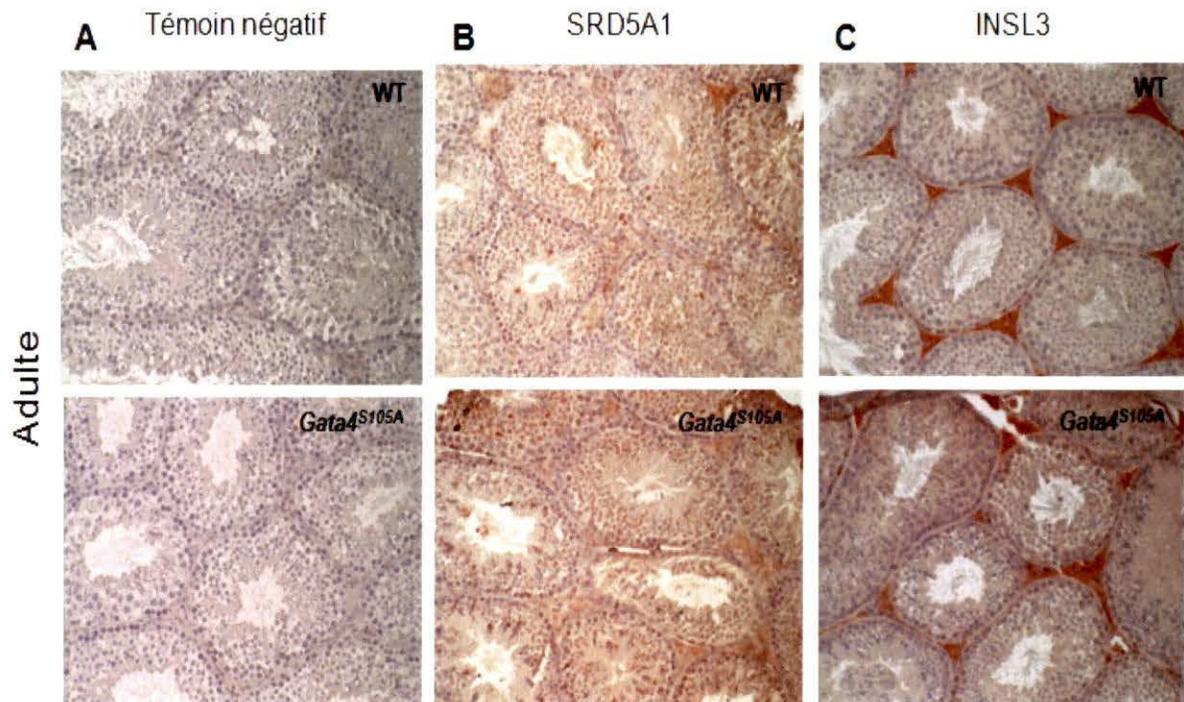


Figure 3.22 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas les marqueurs des cellules de Leydig au stade adulte

La présence des protéines SRD5A1 (B) et INSL3 (C) a été évaluée par immunohistochimie sur des coupes paraffinées de testicules de souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S105A} obtenues au stade adulte. (A): témoin négatif, sans anticorps primaire. Les images ont été prises à un grossissement de 200x.

B- Génération et caractérisation de la lignée *Gata4*^{S261A}

3.14 Stratégie de construction utilisée

L'activité de GATA4 s'est montrée maximale dans des lignées cellulaires gonadiques suite à la phosphorylation via PKA au niveau de son résidu sérine 261. Cependant, la contribution endogène de la sérine 261 dans la fonction de GATA4 dans les testicules et les ovaires n'a jamais été déterminée. Dans le but de mieux comprendre l'importance physiologique de la phosphorylation de GATA4 sur le résidu sérine 261 dans les gonades, nous avons généré une lignée de souris *Gata4*^{S261A} qui porte une mutation de ce résidu sérine.

La mutation a consisté à remplacer la sérine 261 de GATA4 par une alanine de façon à prévenir la phosphorylation sur ce site. Notre stratégie a consisté à déléter et remplacer l'exon 2 (contenant l'ATG) du locus endogène par notre construction constituée de l'ORF de GATA4 avec la sérine mutée, flanquée d'une étiquette FLAG, d'un IRES-GFP qui va permettre la co-expression de GFP dans cellules exprimant la protéine mutée et d'une cassette de sélection Neo pour sélectionner les cellules souches embryonnaires transfectées. L'ADN muté a ensuite été transféré dans des cellules souches embryonnaires afin qu'il s'intègre dans le génome par recombinaison homologue. Des clones positifs de cellules souches ayant résistées au traitement à la néomycine et donc ayant intégrés l'ADN muté ont été isolés et identifiés par Southern blot (figure 3.23A). Ces clones ont été micro-injectés dans des blastocystes de souris C57BL/6 afin de générer des souris chimères dont le croisement avec des souris C57BL/6 nous a permis d'obtenir des souris hétérozygotes *Gata4*^{+S261A} (figure 3.23B).

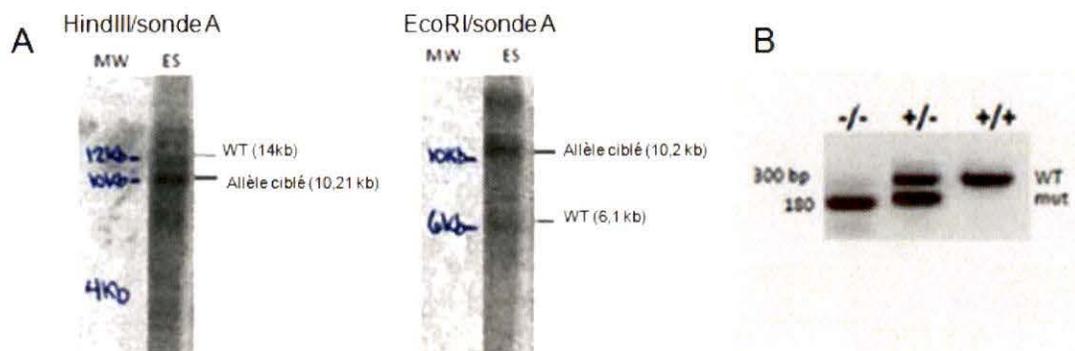


Figure 3.23 Vérification de l'évènement de recombinaison dans les clones GATA4 S261A de cellules souches embryonnaires sélectionnés

(A) Analyses Southern confirmant l'évènement de recombinaison prédit à la fois sur les extrémités 5' et 3' pour un clone de cellules souches embryonnaires utilisé pour générer des chimères. L'ADN génomique a été analysé en utilisant une combinaison d'enzymes de restriction et de sondes indiquée. MW, échelle de poids moléculaire 1kb ; ES, ADN génomique de cellules souches embryonnaires. (B) Analyse par PCR de l'ADN génomique à partir d'un punch d'oreille d'une souris issue de la progéniture F1.

3.15 Les souris hétérozygotes *Gata4*^{S261A} se reproduisent normalement mais ne respectent pas le ratio mendélien

Le croisement des souris chimères obtenues suite à la micro-injection avec des souris de type sauvage (C57BL/6) a permis l'obtention de souris hétérozygotes *Gata4*^{S261A} viables qui se reproduisent normalement. Cependant, la mise en croisement de souris hétérozygotes entre elles pendant plusieurs mois ne nous a malheureusement pas permis d'obtenir des souris homozygotes *Gata4*^{S261A}. De plus, les rapports mendéliens attendus pour un tel croisement entre hétérozygotes n'étaient pas respectés. En effet, pour un total de 117 souris génotypés à l'âge du sevrage (21 jours post-natal), nous avons obtenu 100 hétérozygotes pour 17 souris de type sauvage contre 0 souris homozygote.

La présence d'une cassette GFP dans notre construction, nous avait permis de détecter la fluorescence dans les gonades de souris *Gata4*^{S261A} hétérozygotes (figure 3.24) laissant penser que notre transgène était bien présent dans leur génome. Pour confirmer que la fluorescence observée provenait effectivement de la présence de la protéine mutée,

nous avons vérifié par essai Western blot la présence chez les hétérozygotes de la protéine GATA4 S261A avec un anticorps anti-FLAG de lapin puisqu'une étiquette FLAG avait également été rajoutée dans notre construction afin de discriminer la protéine mutée de la protéine GATA4 endogène. Pour une raison que nous ignorons, la majorité de nos essais de Western blot n'ont pas donné le résultat attendu puisqu'en effet nous détectons une bande autour de 50 KDa correspondant au poids moléculaire attendu pour GATA4, dans les gonades des souris *Gata4*^{S261A+/-} mais qui se retrouvait également chez les souris C57BL/6 utilisées comme témoin négatif (figure 3.25).

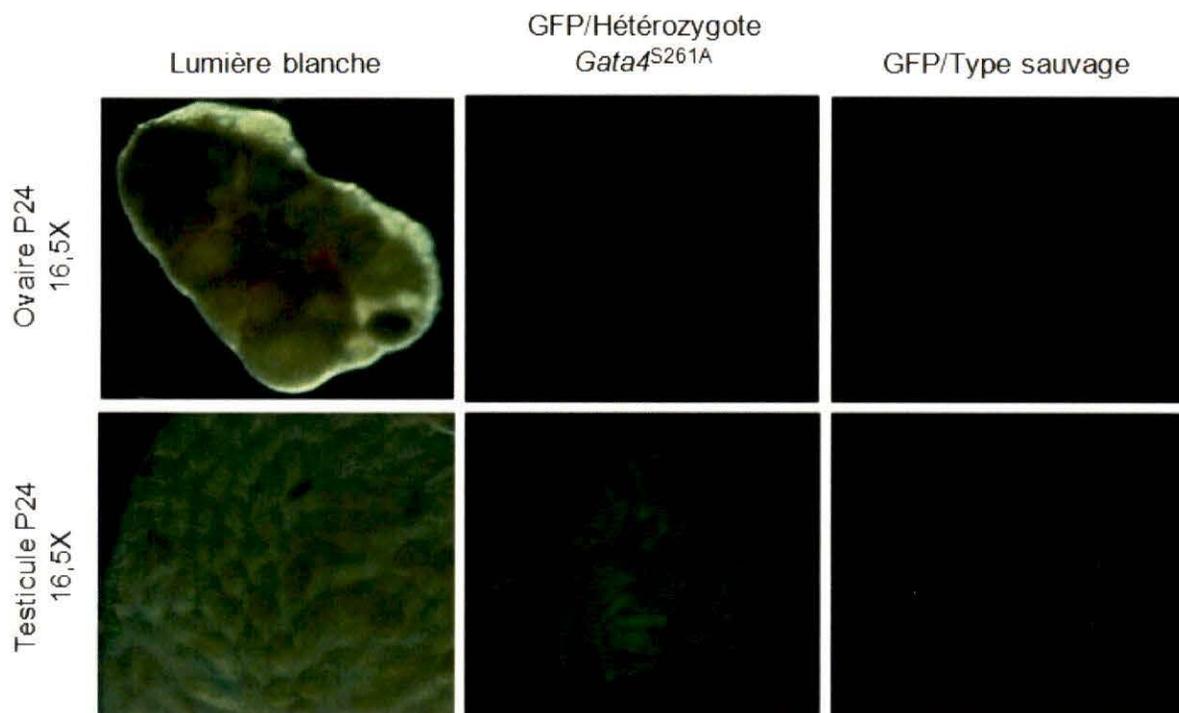


Figure 3.24 Détection de GFP dans les gonades des souris *Gata4*^{S261A} hétérozygotes

Des ovaires ainsi que des testicules de souris de type sauvage et *Gata4*^{S261A} hétérozygotes âgées de 24 jours, prélevés et placés dans du PBS (1x) sont observés à lumière blanche puis par fluorescence (camera Leica DFC 495/microscope Leica M205 FA). Malgré sa faible intensité, la fluorescence est détectée de façon diffuse uniquement dans les gonades des souris *Gata4*^{S261A} hétérozygotes.

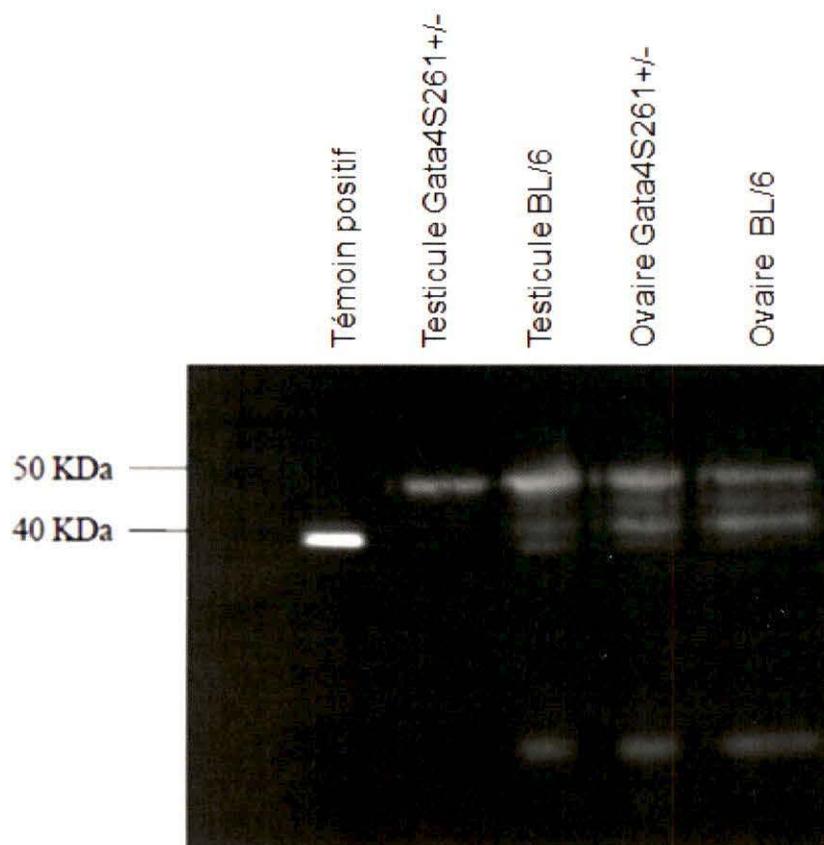


Figure 3.25 Vérification par Western blot de la présence de la protéine GATA4 S261A dans les gonades de souris *Gata4*^{S261A} hétérozygotes

Des extraits nucléaires des gonades de souris de type sauvage et *Gata4*^{S261A} hétérozygotes âgées de 20 jours post-natal ont été utilisés pour détecter la présence de la protéine mutée à l'aide d'un anticorps anti-FLAG de lapin (1/1000).

3.16 L'absence des souris homozygotes $Gata4^{S261A}$ n'est pas liée à une mortalité embryonnaire

Vu l'absence de souris $Gata4^{S261A}$ homozygotes, nous avons pensé que la mutation S261A pouvait être létale, empêchant par conséquent la naissance d'homozygotes viables. Nous avons donc procédé à une recherche d'embryons homozygotes *in utero* au stade précoce de gestation en commençant par le stade embryonnaire E12,5 jusqu'au stade E8,5 coïncidant avec le début de l'expression de $Gata4$. Ces recherches menées sur près de 80 embryons (tableau 3.7) de différents stade de développement n'ont pas validé notre hypothèse puisqu'aucun homozygote n'a été génotypé et aucun défaut morphologique apparent n'a été observé sur les embryons.

Tableau 3.7 Récapitulatif de l'investigation sur la présence des embryons homozygotes $Gata4^{S261A}$ *in utero*

Stade de développement	E12,5	E9,5	E8,5	Total embryons
Nombre d'embryons	12	35	35	82
Homozygotes	0	0	0	0

3.17 Alternatives utilisées pour trouver des souris *Gata4*^{S261A} homozygotes

Pour vérifier que l'absence d'homozygotes n'était pas liée à un problème intrinsèque à notre génotypage lui-même, nous avons repensé notre stratégie et nous avons donc redessiné nos oligos. Les génotypages avec les nouveaux oligos nous ont permis de détecter des souris *Gata4*^{S261A} homozygotes viables malgré la persistance d'une bande de 300 bp de faible intensité correspondant à l'allèle de type sauvage (figure 3.26).

Nous avons également utilisé les gonades de ces souris *Gata4*^{S261A} homozygotes au stade post-natal 24 jours afin de vérifier l'expression du transgène GATA4 S261A par fluorescence. À notre surprise, notre transgène était exprimé dans les cellules germinales (figure 3.27) et non dans les cellules somatiques où devrait s'exprimer GATA4. Ce résultat inattendu a mis fin à nos espoirs de poursuivre la caractérisation de cette lignée.

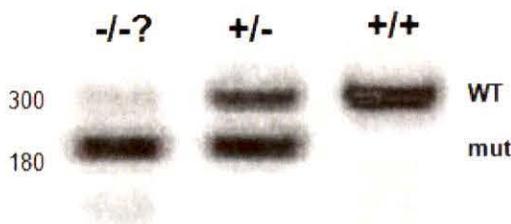


Figure 3.26 Génotypage des souris *Gata4*^{S261A} suite au changement d'oligos

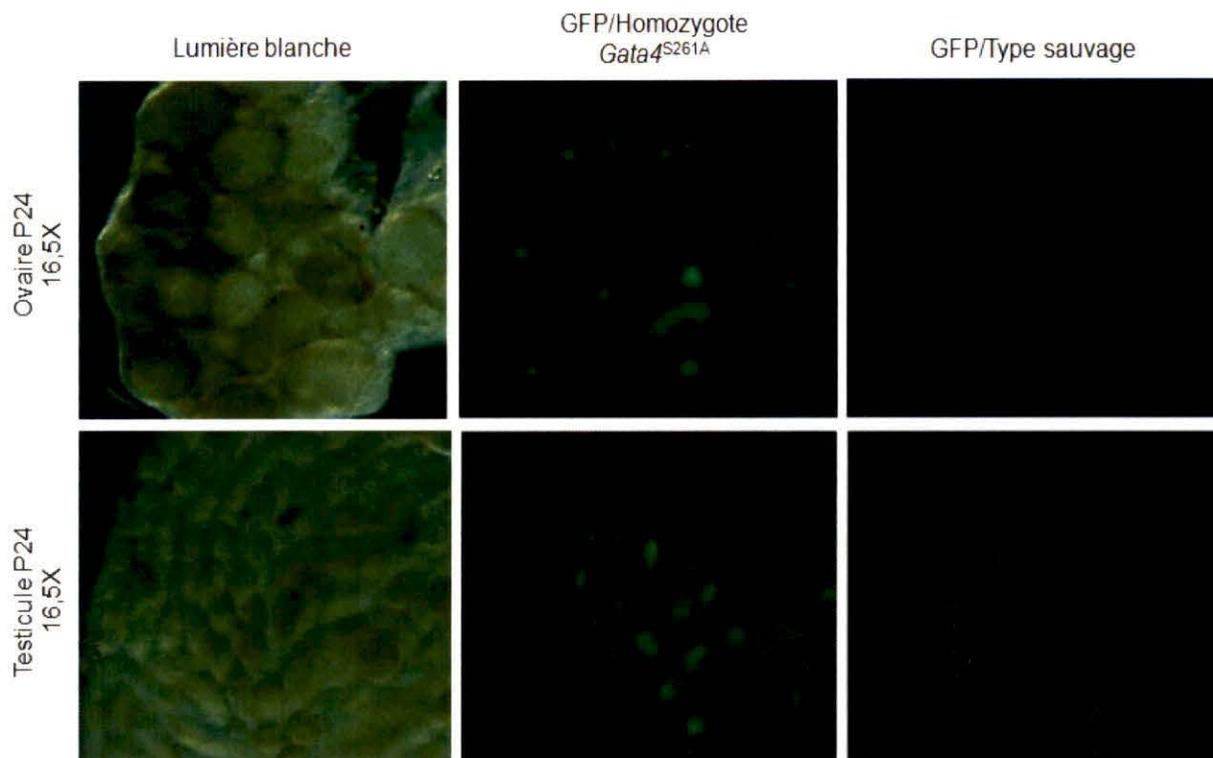


Figure 3.27 Détection de GFP dans les gonades des souris *Gata4*^{S261A} homozygotes

Des ovaires et des testicules de souris de type sauvage et homozygotes *Gata4*^{S261A} âgées de 24 jours post-natal, prélevés et maintenus dans du PBS (1x) sont observés à lumière blanche puis par fluorescence (camera Leica DFC 495/microscope Leica M205 FA). Les gonades des souris de type sauvage présentent de l'auto-fluorescence alors qu'on perçoit chez les homozygotes un marquage plus intense au centre des cellules folliculaires et des tubes séminifères qui cible les cellules germinales. Grossissement 16,5x.

CHAPITRE IV : DISCUSSION

I- RÔLE ENDOGÈNE DU MOTIF EBOX DANS LA TRANSCRIPTION DE *Gata4*

4.1 L'insertion de la cassette Neo a conduit à la génération d'un allèle *Gata4* hypomorphique sévère

La méthode de ciblage génétique utilisée dans cette étude a conduit à la génération d'un nouvel et inattendu allèle *Gata4* hypomorphique sévère. En effet, nous avons constaté que les animaux homozygotes pour l'allèle *Gata4*^{EboxKO-Neo} ayant conservé la cassette de sélection PGKp-Neo flanquée de sites LoxP dans l'intron 1a-2, récapitulent le phénotype des souris *Gata4*-nulles et meurent autour du jour embryonnaire E9,5. L'excision par la récombinase Cre a confirmé que cette létalité embryonnaire résulte de la seule présence de la cassette Neo. Il existe plusieurs possibilités pour expliquer cette mortalité. Nous pouvons considérer que la présence des séquences exogène PGKp-Neo pourraient entraîner une diminution générale du nombre total de transcrits codant pour la protéine GATA4 soit en raison d'une compétition entre les promoteurs causée par la présence des séquences PGKp, de l'épissage anormal de l'exon 2 ou alors de la déféctuosité de séquences régulatrices introniques. En appui à notre cette hypothèse, il est connu que l'expression spécifique au tissu de *Gata4* peut être régulée par l'intermédiaire d'enhancers ou activateurs transcriptionnels localisés dans les introns (Burch, 2005) et justement un activateur transcriptionnel fonctionnel de *Gata4* a récemment été identifié dans l'intron 2 (Rojas *et al.*, 2010). Cependant, le fait qu'un site loxP demeure dans l'allèle *Gata4*^{EboxKO} suivant la recombinaison médiée par la Cre exclut la possibilité que le phénotype soit dû à l'interruption fortuite d'un élément régulateur clé de *Gata4* suivant l'insertion.

D'autre part, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'insertion de la cassette Neo de 3 kb pourrait avoir isolé certains éléments régulateurs cruciaux pour

l'expression de la majorité des différents transcrits *Gata4*. Prenant en compte cette possibilité, notre procédure de ciblage a conduit à l'insertion de la cassette Neo dans une délétion de 80 paires de base afin de compenser pour l'insertion finale des sites loxP et de séquences plasmidiques adjacentes suivant l'excision de la cassette par la Cre. Cette stratégie a permis de préserver exactement le même espace d'origine après la recombinaison médiée par la Cre.

Ce nouvel allèle *Gata4*^{EboxKO-Neo} représente un outil génétique intéressant pour l'exploration des fonctions de GATA4 à condition de l'utiliser dans un système comme par exemple avec une souris, permettant une restauration appropriée des défauts ventraux. Étant donné que de tels défauts chez les souris *Gata4*-nulles sont causés par un endoderme viscéral défectueux, la souris transsthyrétine-Cre représenterait par exemple un bon modèle à utiliser pour le restaurer (Kyronlahti *et al.*, 2011; Narita *et al.*, 1997).

4.2 Le transcrit *Gata4* E1b assure la production efficace de la protéine GATA4

La mutation du motif Ebox conduit à une diminution significative et spécifique de l'expression du transcrit E1a (entre 70 et 89 %) dans les tissus gonadiques et extra-gonadiques. Le maintien d'un minimum d'expression du transcrit 1a dans les tissus examinés pourrait être attribué au rôle des autres motifs conservés (GC-box) dans l'activité du promoteur 1a (Mazaud Guittot, 2007). Les résultats de qPCR réunis indiquent clairement que le motif Ebox localisé juste en amont de l'exon 1a, est un élément régulateur clé et spécifique de l'expression *in vivo* du transcrit E1a de *Gata4* dans plusieurs tissus possédant GATA4 au cours du développement. Cependant, les niveaux de la protéine ainsi que la morphologie des tissus n'étaient étonnamment pas affectés dans les gonades des homozygotes *Gata4*^{EboxKO}. Ceci indique que le transcrit E1b, dont les niveaux n'ont pas été affectés ou sont légèrement augmentés notamment dans les gonades des mutants *Gata4*^{EboxKO} au stade embryonnaire, semble être favorisé au cours de la traduction et assure la production adéquate d'une protéine GATA4 normale et fonctionnelle. Ce résultat est en totale conformité avec nos travaux antérieurs où nous avons montré par analyse de polysomes que les deux transcrits *Gata4* E1a et E1b sont activement traduits dans les testicules de souris (Mazaud Guittot *et al.*, 2009). Cette

observation soulève également la possibilité qu'au moins dans certaines circonstances, chaque transcrit généré à partir d'un promoteur différent, peut être traduit avec une efficacité différente.

A cet égard, il est intéressant de noter que, parmi les différentes façons par lesquelles la traduction peut être régulée, la structure secondaire de l'UTR 5' est connue pour avoir une profonde influence sur l'efficacité de la traduction (Gingold et Pilpel, 2011). En effet, il a déjà été montré que les structures lâches à l'extrémité 5' favorisent tandis que les structures serrées inhibent la traduction (Kudla *et al.*, 2009; Wang, L. et Wessler, 2001). À l'appui d'un tel modèle pour la traduction des transcrits *Gata4*, les ARNm E1a et E1b ne diffèrent précisément que par leur extrémité 5'UTR et cela semble être suffisant pour générer des variantes d'ARNm avec différentes structures secondaires prédites (Mazaud Guittot *et al.*, 2009). À l'aube de ce travail, certaines questions méritaient des investigations supplémentaires. Comment par exemple expliquer pourquoi le transcrit E1b est favorisé quand les niveaux du transcrit 1a diminuent? Cet avantage est-t-il permanent ou alors n'intervient-il que dans certaines circonstances?

La structure secondaire en tige boucle prédite pour l'ARNm E1b (Mazaud Guittot *et al.*, 2009) pourrait contenir dans ses extrémités 5'UTR des régulateurs d'ARN, éléments d'ARN structurés similaires aux IRES (internal ribosome entry site) viraux, qui facilitent le recrutement des ribosomes et l'initiation de la traduction, leur procurant ainsi un avantage sur les ARNm E1a au cours de la traduction. Ce système de traduction IRES dépendante a été récemment rapporté pour certains transcrits de gènes *Hox* par le groupe de Barna (Xue *et al.*, 2014) et nécessite la présence d'un élément inhibiteur de la traduction coiffe dépendante (TIE) prédominante pour la majorité des transcrits chez les mammifères.

4.3 La transcription du transcrit *Gata4* E1b est favorisée dans certaines conditions

Une réponse à cette question a été suggérée dans une publication récente par notre équipe (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014). Dans cette même étude, les expériences effectuées *in vitro* dans des cellules hétérologues ont démontré que *Gata4* peut réguler à la hausse sa propre expression au niveau de son promoteur 1b. De plus, l'analyse de l'expression des transcrits *Gata4* E1a et E1b dans des embryons de souris exprimant une délétion conditionnelle de *Gata4* dans les gonades, a montré une augmentation significative des niveaux du transcrit E1b par rapport aux gonades des souris de type sauvage (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014). Ces données sont en parfaite adéquation avec nos résultats de PCR quantitative qui ont montré que dans les tissus (testicules, cœur et foie) embryonnaires des homozygotes *Gata4*^{EboxKO}, une augmentation significative des niveaux du transcrit E1b est observée alors que le transcrit E1a est fortement diminué (Boulende Sab *et al.*, 2011). Le recours au transcrit 1b au stade embryonnaire est un mécanisme efficace pour éviter une baisse de la protéine à cette étape déterminante du développement. L'ensemble de toutes ces données a finalement permis de suggérer un modèle selon lequel dans des conditions normales, la transcription à partir du promoteur 1a est suffisamment forte pour générer des transcrits *Gata4* E1a pour une production abondante de la protéine GATA4. Et dans ce contexte, l'activité du promoteur 1b est réprimée par l'action du tandem GATA4/FOG2 (figure 4.1A). Cependant, dans des contextes où la transcription du promoteur 1a diminue ou lorsque les niveaux de la protéine GATA4 atteignent un seuil critique, l'inhibition par rétroaction négative exercée par le complexe GATA4/FOG2 sur le promoteur 1b est levée, permettant ainsi de réguler à la hausse l'activité du promoteur 1b afin de s'assurer que les cellules disposent de suffisamment de transcrits pour garantir la synthèse et la fonction adéquate de GATA4 (figure 4.1B) (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014).

Le recours aux promoteurs alternatifs ainsi que l'utilisation de différents sites d'initiation de la transcription n'est pas spécifique à *GATA4*, c'est un mécanisme couramment observé dans la régulation différentielle de gènes présentant un profil d'expression spatio-temporel (Ayoubi et Van De Ven, 1996). La caractérisation de la

lignée *Gata4*^{EboxKO} ayant montré une variation des niveaux d'expression des transcrits 1a et 1b de *Gata4* dans les gonades et les tissus extra-gonadiques, selon les stades de développement ne fait pas exception à cette règle. Et c'est le cas pour les autres membres de la famille GATA. Par exemple, il est connu que le gène *Gata1* chez la souris est transcrit à partir de deux promoteurs distincts. Alors qu'un promoteur distal contrôle l'expression spécifique dans les testicules, un promoteur plus proximal dirige l'expression dans les cellules hématopoïétiques (Ito *et al.*, 1993; Onodera *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1991). De façon similaire, le gène *Gata2* chez la souris possède en amont un promoteur à partir duquel sont générés des transcrits qui contrôlent son expression dans les cellules hématopoïétiques tandis qu'un promoteur situé en aval dirige l'expression du gène dans toutes les cellules exprimant *Gata2* incluant les gonades (Minegishi *et al.*, 1998). L'usage alternatif de l'exon 1, a également été rapporté chez les gènes *GATA6* humain et murin. Au contraire du gène *Gata6* transcrit à partir d'un promoteur unique chez le poulet (He et Burch, 1997), le gène *GATA6* comme *GATA4* chez les mammifères contient en amont deux exons alternatifs non codants transcrits à partir de deux promoteurs distincts (Brewer *et al.*, 1999).

4.4 Le recours au transcrit E1b est accentuée au stade embryonnaire

Nos données de qPCR concernant les souris *Gata4*^{EboxKO} montrent que parallèlement à la forte baisse du transcrit E1a, il y a une augmentation significative de l'expression du transcrit E1b aussi bien dans les gonades, surtout les testicules, que dans le cœur et le foie essentiellement au stade embryonnaire. Mais comment justifier que les niveaux du transcrit E1b demeurent stables aux autres stades de développement alors que la forte diminution du transcrit E1a est toujours présente? J'élabore deux hypothèses.

Chez la souris, l'expression de *Fog2* dans les gonades en développement débute entre les jours E10,5-11,5 et corrèle avec l'expression de *Gata4* dans les deux sexes jusqu'au stade E13,5 puis les niveaux d'expression de *Fog2* baissent nettement dans le testicule foetal et demeurent faibles jusqu'au terme du développement embryonnaire (Anttonen *et al.*, 2003; Manuylov, Smagulova, *et al.*, 2007; Tevosian *et al.*, 1999). Au stade post-natal,

Fog2 est exprimé dans les cellules de Sertoli, de Leydig et la capsule testiculaire (Ketola et al., 2002; Tsang et al., 1997; Lu et al., 1999). Cependant, L'avancée de la spermatogénèse modifie ce patron d'expression puisque *Fog2* se retrouve plutôt exprimé dans les cellules germinales (Ketola et al., 2002). Dans l'ovaire post-natal, FOG2 est exprimée dans les cellules de la Granulosa, de la thèque des follicules en croissance ainsi que dans les cellules luthéales (Anttonen et al., 2003). Il a été démontré que GATA4/FOG2 réprime l'expression du transcrit 1b très tôt au cours du développement (Mazaud et al., 2014). Au stade E15,5, les étapes majeures ayant permis la détermination du sexe étant complétées, l'interaction GATA4-FOG2 pourrait progressivement diminuer en lien avec la baisse des niveaux de FOG2. Ceci aboutit à une levée de l'inhibition exercée par le tandem GATA4-FOG2 au niveau du promoteur 1b au stade embryonnaire permettant ainsi la transcription puis la traduction des transcrits E1b (figure 1.13). Par contre aux stades prépubère et adulte, il y'a un accroissement des niveaux protéiques ainsi que de l'interaction de GATA4 et FOG2 qui entraîne une répression de l'activité du promoteur 1b stabilisant ainsi les niveaux des transcrits E1b. Enfin, si l'on regarde au niveau de la traduction on pourrait suggérer qu'à ce stade embryonnaire, un niveau de protéine GATA4 est nécessaire pour parachever la différenciation des gonades et assurer leur fonctionnalité. Un mécanisme, encore à élucider, pourrait alors déclencher une voie de secours en accentuant la traduction des transcrits 1b qui présentent une structure secondaire similaire à celle des gènes *Hox* et qui facilite le recrutement des ribosomes (Xue et al., 2014).

4.5 Identification des partenaires d'interaction du motif Ebox

La méthode de purification des facteurs de liaison du motif Ebox que nous avons choisie a été utilisée avec succès par certains auteurs pour identifier les protéines se liant au motif Ebox du placenta et caractériser les facteurs nucléaires qui modulent le promoteur de l'apolipoprotéine D respectivement (Fürbass et al., 2010; Levros et al., 2010). Les bandes que nous avons ciblées au cours de notre expérience étaient de tailles variées et le profil de bandes obtenu était différent dans les testicules et les ovaires au stade prépubère et adulte. Les données recueillies aux stades prépubère et adulte

suggèrent que le profil de distribution des facteurs nucléaires liant le motif Ebox du promoteur proximal E1a de *Gata4* semble varier en fonction du sexe et du stade de développement.

Dans mes études, la méthode avec les extraits nucléaires des gonades au stade prépubère et adulte m'a permis d'observer un même profil de bandes dans les testicules et les ovaires après 2 ou 3 expériences indépendantes. Cependant, l'utilisation d'extraits de cellules de Sertoli immortalisées comme témoin positif pour valider nos essais avec les tissus entiers ne m'a pas permis d'isoler des bandes exploitables en spectrométrie de masse après de longs mois d'efforts. J'ai en effet été incapable d'isoler les facteurs USF1/2 qui avaient auparavant été identifiés comme des facteurs de liaison du motif Ebox de *Gata4* *in vitro* (Mazaud Guittot *et al.*, 2007). Il serait tout à fait possible que les cellules MSC-1 de Sertoli n'expriment pas les facteurs USF1/2. D'ailleurs, nous aurions dû vérifier leurs niveaux d'expression par Western blot.

Une des bandes analysées (bande 2 d'~ 30 KDa) avec les extraits d'ovaire de souris adulte m'a toutefois semblé intéressante. En effet, un peptide d'~ 33 KDa (poids quasi-similaire à celui attendu) m'a été suggéré. Il encoderait pour la 17- β -Oestradiol déhydrogénase de type 11, une enzyme impliquée dans la synthèse des oestrogènes au cours de la stéroïdogénèse. Serait-il possible que cette enzyme par une association de type protéine-protéine se lie au motif consensus Ebox du promoteur 1a de *Gata4* pour activer ou maintenir sa transcription pendant la stéroïdogénèse? Le rôle majeur de GATA4, confirmé par de nombreuses études, dans la régulation de plusieurs enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse soutiendrait cette hypothèse.

Les essais de spectrométrie de masse n'ont donc pas généré des données satisfaisantes vu que la différence entre le poids moléculaire des bandes ciblées et extraites des gels avec celui des protéines identifiées par spectrométrie était problématique. Il est bien connu que le poids d'une protéine native peut subir des variations consécutives à des modifications se produisant après sa traduction. Pour vérifier que de telles modifications n'affectent pas le poids des protéines d'intérêt, j'ai demandé au service de protéomique une analyse plus spécifique qui n'a par contre pas

permis de retenir cette éventualité. Comment alors valider notre essai de protéomique et poursuivre notre analyse sans disposer de témoin positif? Tel a été le problème que je devrais surmonter. Fallait-il refaire une analyse spectrométrique avec d'autres bandes extraites du gelet conservées à -80°C pour avoir une idée plus représentative des résultats? Un seul essai en spectrométrie n'était pas suffisant pour conclure. J'ai pensé ne pas poursuivre l'analyse des autres bandes sans contrôle positif notamment au vu des coûts associés à l'analyse spectrométrique. À mon avis, mon expérience de protéomique a mal fonctionné.

Comme alternative à cette technique, je propose d'explorer la technique du mono hybride en système de levure (figure 4.1) qui permet d'identifier des facteurs de transcription interagissant avec une séquence régulatrice spécifique d'ADN. Ce système présente un double avantage. Il permet de conserver l'intégrité des protéines incluant leur repliement adéquat et les modifications post-traductionnelles qui s'y produisent. Avec cette technique, on peut surtout détecter des facteurs de transcription même faiblement exprimés à des seuils que la spectrométrie de masse ne peut atteindre. Brièvement, de multiples copies d'oligo contenant le motif Ebox intact (séquence appât) ou muté (rapporteur témoin) seront clonées en amont d'un gène rapporteur HIS3 (histidine) puis transféré dans le vecteur d'intégration pINT1. Une librairie d'ADNc sera générée (si non disponible commercialement) à partir de testicules ou d'ovaire de souris de type sauvage au stade embryonnaire, prépubère et adulte.

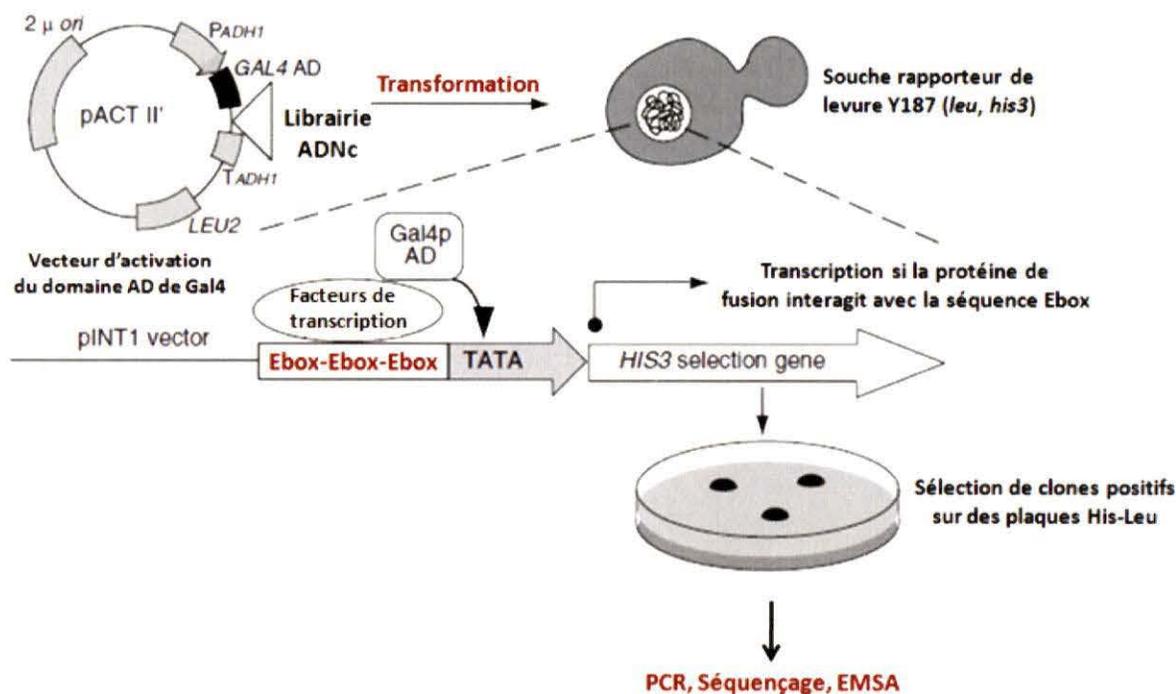


Figure 4.1 Aperçu de la technique du mono hybride en système de levure pour l'identification des partenaires de liaisons du motif Ebox de *Gata4*
Adapté de (Ouwerkerk et Meijer, 2001).

L'ADNc sera exprimé à partir du promoteur *ADHI* et sera fusionné avec la séquence du domaine d'activation (AD) du facteur de transcription de levure Gal4p. L'ensemble sera ensuite transformé dans des souches de levure Y187. La détection de l'interaction se fait par activation du marqueur de croissance de l'*HIS3*. La reconnaissance et la liaison d'un facteur de transcription à la séquence Ebox cloné en amont du gène *HIS3* entraîneront son expression permettant ainsi la formation de colonies sur un milieu déficient en histidine et leucine. Les colonies His⁺ sont repiquées dans un milieu frais afin qu'elles soient plus visibles et les inserts d'ADNc sont amplifiés par PCR, séquencés et analysés par BLAST.

II- Caractérisation du rôle des sites de phosphorylation S105 et S261 sur la fonction de la protéine GATA4 chez la souris

4.6 La mutation GATA4 S105A altère les niveaux sériques de la testostérone, de la LH et affecte la taille des tissus reproducteurs

Nos résultats de pesée ont démontré que les mâles *Gata4*^{S105A} adultes présentaient une augmentation significative du poids des testicules ainsi qu'une réduction notable du poids de la prostate et des autres glandes accessoires du tractus reproducteur mâle. Ces variations corrélaient avec la baisse significative des niveaux de testostérone sérique chez ces animaux. Le contrôle de l'activité des testicules est réalisé par la boucle hypothalamo-hypophysaire gonadique qui sécrètent les gonadostimulines FSH et LH. Tandis que la FSH stimule indirectement la spermatogenèse dans les testicules, la LH stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig. Les niveaux de LH sont négativement régulés par la testostérone et donc augmentent quand le taux de testostérone diminue. Ce que notre analyse par ELISA a justement confirmé (figure 3.12). Nos résultats suggèrent que la phosphorylation de la sérine 105 de GATA4 est nécessaire pour la synthèse de testostérone.

L'augmentation du poids des testicules dans le contexte physiologique de réduction importante du taux de testostérone sérique chez les mâles *Gata4*^{S105A} apparaît donc normale. En effet, lorsque la concentration sanguine de testostérone produite par le testicule augmente trop, celle-ci exerce à son tour un rétro-contrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ralentissant ainsi l'activité de l'hypothalamus entraînant par ricochet une baisse de la production des gonadostimulines et donc de la testostérone. À l'inverse, si la concentration de testostérone diminue fortement comme c'est le cas chez nos mutants *Gata4*^{S105A}, le rétrocontrôle négatif sur les cellules hypothalamiques est réduit. Il en résulte une augmentation de la sécrétion de LH et probablement aussi de la FSH conduisant à une stimulation plus importante et continue des cellules de Leydig et de Sertoli. La stimulation de ces deux types cellulaires devraient entraîner leur prolifération (ce que nous ne pouvons pas confirmer puisque nous ne les avons pas quantifié) avec pour conséquence une augmentation de la taille des testicules. Des études

antérieures ont d'ailleurs souligné que le nombre de cellules de Sertoli est le principal facteur contributif de la taille finale des testicules à l'âge adulte (Sharpe et al., 2003; Johnson et al., 1984; Orth et al., 1988).

De même, dès le stade embryonnaire, la prostate, l'épididyme tout comme les vésicules séminales sont exposées à l'action permanente de la testostérone, indispensable pour leur développement. La diminution de taille des vésicules séminales, de l'épididyme mais surtout de la prostate est donc en conformité avec la baisse des niveaux de testostérone suggérant une réduction de l'exposition aux androgènes ou alors une action insuffisante de ces derniers au stade adulte chez les mâles *Gata4*^{S105A}.

4.7 La mutation GATA4 S105A cause une réduction significative de la stéroïdogénèse au stade adulte sans affecter la fertilité

Nos résultats indiquent que la mutation GATA4 S105A régule à la baisse l'expression de gènes impliqués dans la voie stéroïdogénique entraînant par ricochet la réduction significative du niveau de testostérone dans les testicules. Toutefois, malgré cette chute vertigineuse des niveaux de testostérone, les souris mâles *Gata4*^{S105A} sont demeurées fertiles. Nos données suggèrent que contrairement aux humains, les rongeurs tolèrent des faibles niveaux de testostérone. À cet égard, nos résultats sont en conformité avec la littérature puisque plusieurs études menées chez le rat ont démontré que la spermatogénèse était maintenue même lorsque les niveaux de testostérone intratesticulaire diminuaient jusqu'à un seuil de 15% (Cunningham et Huckins, 1979; Huang et Nieschlag, 1986; Zirkin *et al.*, 1989). En sachant que près de 95% de la testostérone circulante est produite par les testicules, une baisse des niveaux de testostérone intratesticulaire est forcément associée à une diminution du taux sérique de testostérone. Nous pouvons donc spéculer qu'une infertilité chez les souris mâles n'aurait été possible que dans les conditions où la mutation GATA4 S105A aurait conduit soit à une absence complète des cellules de Leydig entraînant un arrêt complet de la production de testostérone (ce qui n'était pas le cas), soit à une baisse encore plus accentuée (entre 90-100%) du niveau de testostérone. La baisse des niveaux d'expression des enzymes impliquées dans la voie stéroïdogénique atteint certainement un seuil mais ce dernier ne

semble pas critique pour interférer avec la spermatogenèse (hypothèse confirmée par notre décompte spermatique) et demeure suffisant pour le maintien de la fertilité des souris mâles *Gata4*^{S105A}.

Nous avons également constaté que le ratio mâle/femelle a été également maintenu dans différentes portées des souris *Gata4*^{S105A} sur 5 générations. En effet, le nombre de rejetons mâles et femelles était identique. Aucun sexe n'a eu de prépondérance sur un autre. Ce résultat suggère que la phosphorylation de GATA4 via sa sérine 105 n'est pas essentielle pour la fécondité des souris mais aussi que l'hypo-phosphorylation de GATA4 seule, causée par la mutation GATA4 S105A n'est pas suffisante pour induire une réversion sexuelle chez les souris *Gata4*^{S105A}. Ce constat est en total désaccord avec l'hypothèse récemment publiée par (Warr *et al.*, 2012) qui ont soutenu que l'hypo-phosphorylation de GATA4 via la sérine 105 chez les embryons de souris *Gadd45y* et *Map3k4* nulles pourrait entraîner une réversion sexuelle caractérisée par une réduction des niveaux d'expression de *Sry* à un stade critique de la détermination du sexe.

Nous ne pouvons pas exclure un rôle éventuel de GATA6 dans le maintien partiel de la stéroïdogénèse et de la fertilité des souris *Gata4*^{S105A} puisque GATA-4 et -6 sont exprimées dans le testicule adulte et possèdent leur site de liaison dans les régions régulatrices de plusieurs gènes stéroïdogéniques (Tremblay et Viger, 2003a). Pour tester cette hypothèse, il serait pertinent d'évaluer la fertilité (stéroïdogénèse incluse) en croisant des souris *Gata4*^{S105A} avec des souris hétérozygotes *Gata6*. Notons qu'en perspective, des investigations spécifiques devraient être effectuées avec les ovaires des souris adultes *Gata4*^{S105A} qui présentent une nette diminution de taille comparativement au contrôle de type sauvage, afin de déterminer si et comment la mutation GATA4 S105A affecte la stéroïdogénèse dans les cellules ovariennes *in vivo*.

4.8 La mutation GATA4 S105A altère le programme de stéroïdogénèse dans les testicules adultes

Les souris *Gata4*^{S105A} ont présenté une baisse jusqu'à 80% du niveau de testostérone consécutive à une réduction significative du niveau des enzymes impliquées dans sa synthèse comme l'ont montré nos résultats d'expression génique et corroboré par les résultats d'immuno-histochimie. Nous avons également vu que cette déficience au niveau hormonale chez ces souris n'étaient associée à un défaut apparent ni au niveau de la reproduction ni au niveau de l'histologie des gonades.

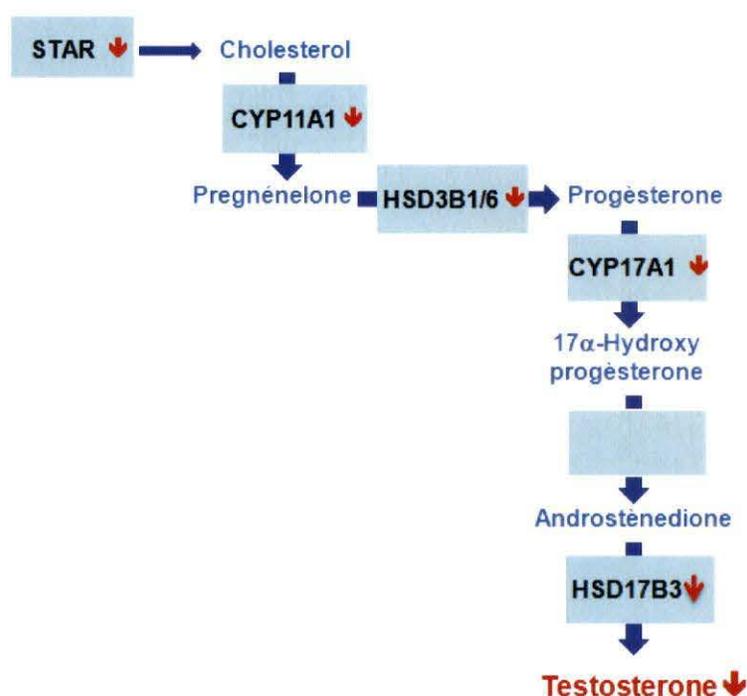


Figure 4.2 Voie simplifiée de synthèse de la testostérone dans les cellules de Leydig

Sont visibles, la diminution importante (flèches rouges) du niveau d'expression des gènes et le niveau de protéines nécessaires à la conversion du cholestérol en testostérone, observée dans les testicules de souris mâles *Gata4*^{S105A}.

La possibilité que la diminution des niveaux de testostérone résulte d'une anomalie de maturation des cellules de Leydig a été levée par l'analyse respective des marqueurs de cellules de Leydig immature SRD5A1 et différenciées INSL3, dont les niveaux sont demeurés comparables à ceux observés chez les souris de type sauvage. L'ensemble de ces résultats révèle que le défaut de phosphorylation de la sérine 105 de GATA4 n'entrave pas la différenciation des cellules de Leydig mais cause une perturbation spécifique du programme de stéroïdogénèse qui se manifeste par une régulation à la baisse de l'expression de plusieurs acteurs de la stéroïdogénèse (figure 4.2).

4.9 Le déficit en testostérone et des enzymes stéroïdogéniques chez les souris *Gata4*^{S105A} n'est pas lié à un changement de structure de la protéine GATA4

En accord avec son rôle établi dans la phosphorylation de GATA4 médiée par la voie des MAPK, la mutation S105A entraîne la régulation à la baisse de plusieurs enzymes stéroïdogéniques clés, conduisant à une réduction significative de production de testostérone dans les testicules des souris *Gata4*^{S105A}. Nous pouvons affirmer que la mutation S105A n'affecte ni la structure ni la quantité de protéine présente. En effet, l'analyse quantitative du niveau des protéines réalisée par (van Berlo *et al.*, 2011) a confirmé que les protéines GATA4 de type sauvage et GATA4 S105A mutée étaient exprimées à des niveaux similaires. Dans le même sillage, nos expériences *in vitro* réalisées antérieurement sur la mutation de la sérine 261 en alanine ont également démontré que la protéine GATA4 de type sauvage et mutée étaient exprimées à des niveaux similaires (Tremblay et Viger, 2003b) et que la mutation n'affectait ni la localisation nucléaire et encore moins la stabilité de la protéine. En s'appuyant sur ces mêmes travaux et des résultats similaires sur la protéine S105A, non publiés de notre laboratoire, nous pouvons conclure qu'à l'instar de GATA4 S261A, la mutation S105A n'entraîne fort probablement aucune incidence sur la structure ni la stabilité de la protéine pouvant expliquer les altérations hormonales et enzymatiques affichées par les mutants *Gata4*^{S105A}.

4.10 La mutation GATA4 S105A n'affecte pas la stéroïdogénèse aux stades précoces

Nos résultats d'immuno-histochimie ont montré que la mutation GATA4 S105A n'affecte pas le niveau des protéines et enzymes impliquées dans la synthèse de la testostérone ni au stade embryonnaire ni au stade prépubère. Les cellules de Leydig au stade foetal sécrètent donc des niveaux de testostérone suffisants pour induire une masculinisation des organes génitaux. Cependant, chez les rongeurs, alors que la LH est absolument indispensable pour la différenciation des cellules de Leydig de type adulte, plusieurs observations suggèrent que la différenciation des cellules de Leydig de type foetal tout comme la production de testostérone ne dépendent pas de la LH. Ce n'est donc que vers la fin de la période foetale que ces cellules expriment les récepteurs de la LH et deviennent plus sensibles à une régulation par les gonadotrophines. Cet état corrèle avec l'augmentation des niveaux de testostérone nécessaires pour la spermatogénèse et au développement des caractères sexuelles secondaires suite à la puberté. Il apparaît donc logique que la mutation S105A n'affecte la stéroïdogénèse des souris *Gata4*^{S105A} qu'au stade adulte.

4.11 Comment expliquer que la sérine 105 qui n'est pas une cible de PKA affecte la stéroïdogénèse?

Dans les cellules gonadiques, la stéroïdogénèse est induite par les hormones et est principalement médiée par la voie de signalisation intracellulaire dépendante de l'AMPc qui conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA) et à la phosphorylation directe de GATA4 sur son résidu sérine 261 (Tremblay et Viger, 2003b). Il a également été rapporté que GATA4 est ciblée directement par la voie MAPK ERK1/2 dans le cœur où la phosphorylation de GATA4 se produit majoritairement sur la sérine 105 (Charron et Nemer, 1999; Liang *et al.*, 2001). L'usage de plus d'un site de phosphorylation constitue pour de nombreuses protéines un important mécanisme de régulation. C'est le cas par exemple de CREB et d'AKT. CREB un partenaire d'interaction de GATA4, qui peut être phosphorylée sur différents résidus sérine par différentes kinases en réponse à divers stimuli (Mayr et Montminy, 2001). AKT est une sérine/thréonine protéine kinase qui

régule de nombreux processus cellulaires incluant la survie, la prolifération, la traduction des protéines et le métabolisme (Manning et Cantley, 2007). L'activité maximale d'AKT dépend du statut de phosphorylation de ces deux résidus thréonine 308 et sérine 473 (James *et al.*, 1996). La protéine GATA4 suit également ce mode de régulation puisqu'elle possède au moins deux sites de phosphorylation S105/261 pouvant être différenciellement phosphorylés en réponse à divers signaux. Bien que GATA4 soit préférentiellement phosphorylée par PKA via la sérine 261 dans les cellules gonadiques, ceci n'exclut pas la contribution de la phosphorylation de la sérine 105 dans ces cellules ou même dans d'autres tissus autre que le cœur comme le prouve nos résultats. D'ailleurs cette possibilité est corroborée par le fait que les cellules gonadiques peuvent répondre à certains stimuli qui activent la voie AMPc sans impliquer PKA (Richards, 2001). Et dans ces circonstances, l'activation de la voie des MAPK qui cible la sérine 105 joue un rôle prépondérant (Richards, 2001). De plus, des études *in vitro* et *in vivo*, réalisées dans les cellules de la Granulosa de rat et de porc, ont démontré qu'en réponse à la stimulation de la FSH, GATA4 est phosphorylée sur son résidu sérine 105 probablement par la voie ERK1/2 et non par la voie classique AMPc/PKA (Tremblay et Viger, 2003b).

A cet égard, nos résultats sur la caractérisation des souris adultes mâles *GATA4^{S105A}* confirment cette hypothèse. Bien que la sérine 105 ne soit pas une cible préférentielle pour la phosphorylation via PKA, elle pourrait toutefois demeurer une cible importante pour la voie MAPK ERK1/2 dans les cellules stéroïdogéniques par une voie alternative dépendante de l'AMPc (Tremblay et Viger, 2003a). D'ailleurs plusieurs études ont fourni la preuve que l'AMPc peut affecter certains processus cellulaires indépendamment de PKA (Cass *et al.*, 1999; Renstrom *et al.*, 1997; Staples *et al.*, 2001). En effet, ces travaux antérieurs ont rapporté que la régulation à la hausse de la leptine par l'AMPc implique un croisement ou chevauchement entre les voies de signalisation PKA et MAPK (Maymo *et al.*, 2010) et ont également montré que l'hCG renforce l'expression de la leptine dans les cellules placentaires impliquant un chevauchement entre les voies AMPc et p38 MAPK (Ge *et al.*, 2011). Par conséquent, la signalisation par la voie de l'AMPc possède d'autres médiateurs en dehors de PKA et parmi eux on retrouve les

protéines Epac (exchange protein directly activated by cAMP) (Gloerich et Bos, 2010). Justement, il a été démontré que la voie AMPc peut réguler la signalisation ERK/MAPK à travers le recrutement des protéines Epac qui se lient à l'AMPc et activent les petites GTPases liées à Ras (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; Stork et Schmitt, 2002). Nous proposons cette voie alternative Epac/AMPc comme un mécanisme possible qui pourrait expliquer comment la sérine 105 de GATA4 affecte la stéroïdogénèse sans être une cible directe de PKA dans les testicules. Pour valider cette hypothèse, nous pourrions dans un premier temps utiliser des cellules de Sertoli (MSC-1) ou de Leydig (MA-10) immortalisées pour évaluer l'implication effective de la voie AMPc/Epac dans la phosphorylation de GATA4 sur le résidu sérine 105. Pour ce faire, nous analyserons l'effet des analogues de l'AMPc et d'Epac sur la phosphorylation de GATA4 après avoir stimulé les cellules par la LH. Nous nous attendions à une augmentation de la phosphorylation en présence de l'analogue de Epac. Enfin, pour étudier le croisement entre les voies PKA, AMPc/Epac et MAPK dans la phosphorylation de GATA4 dans les cellules gonadiques, les cellules seront traitées avec la LH puis avec H89, un inhibiteur de PKA et/ou en présence d'un analogue de la voie Epac. Après la stimulation, les cellules seront lysées et la phosphorylation de GATA4 sur la sérine 105 sera évaluée par Western blot en utilisant un anticorps spécifique anti-phosphoS105. Nous nous attendions à une augmentation de la phosphorylation de GATA4 en dépit de l'inhibition de PKA, ce qui confirmerait une implication de la voie AMPc/Epac dans la phosphorylation de GATA4 dans les gonades indépendamment de la voie classique AMPc/PKA.

4.12 La lignée *Gata4*^{S261A} exprime le transgène dans les cellules germinales

La recherche de souris *Gata4*^{S261A} homozygotes après de longs mois nous avait conduits à repenser notre stratégie de génotypage et de redessiner des oligos qui nous ont permis d'identifier des homozygotes après croisement entre souris hétérozygotes. Même des rétro-croisements entre homozygotes et souris de type sauvage avaient été réalisés dont le but de vérifier et confirmer le génotype de notre lignée. Nous avons donc avec regret mis un terme à ce projet puisque nous ne pouvions caractériser ces homozygotes qui expriment GATA4 S261A dans les cellules germinales alors que GATA4 est

normalement exprimée dans les cellules somatiques des gonades. En perspective, nous pourrions peut être affiner notre stratégie de génération de la lignée en modifiant notre construction (vecteur de ciblage) dans un souci de rendre plus efficace la recombinaison homologue. À cet effet, nous retirerions le IRES-GFP et floxerions la cassette Neo de sites loxP qui seront plus tard retirés par croisement avec une souris exprimant la recombinaise Cre comme nous l'avons fait pour générer la lignée *Gata4^{EboxKO}*. Après la vérification de l'évènement de recombinaison par Southern blot, nous pourrions séquencer l'ADN des clones de cellules souches embryonnaires présentant le profil attendu afin de vérifier la mutation de la sérine en alanine.

Avec les souris homozygotes *Gata4^{S261A}*, nous nous attendions à voir une diminution plus importante du niveau de testostérone (probablement au delà de 90%) qui pourrait affecter la spermatogenèse et donc la fertilité des mâles. Nous pourrions également croiser les souris homozygotes *Gata4^{S261A}* avec des homozygotes *Gata4^{S105A}* afin de générer des souris doubles hétérozygotes *Gata4^{S105A/S261A}* que nous caractériserions. Enfin, il serait très intéressant de générer une lignée double mutante selon les mêmes procédures que les souris *Gata4^{S105A}* ou *Gata4^{S261A}* mais en effectuant au préalable une mutation simultanée des sérines 105 et 261 par mutagenèse dirigée. La caractérisation des lignées doubles hétérozygotes et doubles mutantes nous fournirait tassurément d'importantes données sur la prépondérance ou la complémentarité de chacun de ses deux résidus sérine et des voies de signalisation qui leurs sont associées dans la fonction gonadique de GATA4. Avec la lignée double mutante *Gata4^{S105A/S261A}* nous espérons observer une abolition complète de la production de testostérone conduisant à une infertilité des souris. Si tel n'était pas le cas, cela mettrait en lumière l'importance d'un autre site phosphoaccepteur de GATA4 dans la stéroïdogénèse. Cela pourrait par exemple être le cas de la sérine 404 cible de la voie MAPK dont les travaux *in vitro* et non publiés de notre laboratoire ont démontré un rôle dans la potentialisation de l'activité de GATA4.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le premier objectif de cette thèse était de générer et caractériser une lignée de souris *Gata4*^{EboxKO} afin de déterminer l'importance du motif Ebox conservé du promoteur proximal dans l'expression de *Gata4* en particulier dans les gonades. Des études antérieures consacrées à l'expression de *Gata4* avaient identifié des séquences régulatrices ou activateurs transcriptionnels localisés dans les introns et qui régulent l'expression tissu spécifique de *Gata4* (Rojas *et al.*, 2010). Notre travail a pour originalité d'aborder pour la première fois la régulation de l'expression de *Gata4* sous l'angle d'un motif consensus de son promoteur proximal à travers un modèle *in vivo* mais aussi d'apporter des évidences claires sur la fonctionnalité des transcrits E1a et E1b qui sont les plus exprimés dans les tissus exprimant GATA4 et les plus conservés parmi différentes espèces, allant des rongeurs à l'homme (Mazaud Guittot *et al.*, 2009).

Notre étude confirme le rôle critique de l'élément Ebox du promoteur proximal de *Gata4* et démontre clairement que ce motif est un élément régulateur clé de l'expression du transcrit E1a *in vivo*. De façon surprenante, nos résultats ont également souligné le fait que, même en l'absence quasi totale du transcrit E1a, le transcrit E1b peut compenser et permettre le maintien des niveaux de protéines GATA4 normales et fonctionnelles. Compte tenu de l'importance cruciale de GATA4 pour le développement et la fonction de nombreux organes, un tel mécanisme de secours garantissant une expression de la protéine spécifique au tissu même dans des moments critiques serait normal. Les données récentes portant sur la caractérisation du promoteur 1b de *Gata4* publiées par notre équipe apportent des précisions intéressantes qui complètent le mécanisme de régulation de l'expression de *Gata4* à partir de deux promoteurs distincts et indépendants (1a et 1b) (figure 3.22) (Mazaud-Guittot *et al.*, 2014).

Notre deuxième objectif concernait l'identification des protéines interagissant avec le motif Ebox *in vivo*. Malgré notre ambition, nous reconnaissons que nos résultats sont insuffisants pour apporter une nouveauté dans ce domaine. L'approche protéomique pour laquelle nous avons opté devra être répétée notamment l'identification par spectrométrie

afin d'en tirer une conclusion définitive sur sa poursuite ou son arrêt. Dans le cas échéant, d'autres techniques telles que celle du simple hybride qui bien que parfois laborieuse pourrait être exploitée pour compléter cet objectif important, pour encore mieux cerner la régulation de l'expression de *Gata4* à différents stades de développement. Notre dernier objectif consistait à évaluer l'importance des résidus sérine 105 et 261 dans la fonction de la protéine GATA4 *in vivo*. Dans cette optique, nous nous sommes attelés à générer deux lignées de souris portant des mutations respectives pour chacune des deux sérines par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (méthode du ciblage génétique). Finalement, seule la caractérisation de la lignée *Gata4*^{S105A} est présentée dans cette thèse, étant donné les soucis que nous avons connus avec la lignée *Gata4*^{S261A} dans laquelle notre transgène GATA4 S261A n'était pas exprimé dans les cellules somatiques, telle que mentionnée précédemment. Les souris *Gata4*^{S105A} homozygotes sont viables et se reproduisent selon les ratios mendéliens. Ces mutants mâles adultes présentent cependant des anomalies au niveau des gonades et des tissus reproducteurs accessoires caractérisés par une augmentation significative de la taille des testicules ainsi qu'une baisse de la taille des autres tissus notamment la prostate. Cet effet sur les tissus androgéno-dépendants est justement associé à une diminution significative des niveaux sériques de testostérone chez les mâles adultes. Notre analyse plus détaillée des marqueurs de fertilité autant par PCR quantitative que par immuno-histochimie a montré que la mutation GATA4 S105A entraîne dans les cellules de Leydig, une régulation à la baisse des protéines et enzymes impliquées dans la cascade de conversion du cholestérol en testostérone, communément appelée stéroïdogénèse. Le maintien des marqueurs des cellules de Leydig adultes (SRD5A1 et INSL3) chez les homozygotes *Gata4*^{S105A} nous permet de soutenir que la réduction des niveaux de testostérone n'est pas liée à un défaut de différenciation des cellules de Leydig mais plutôt à une altération spécifique du programme de stéroïdogénèse lui-même induite par la mutation GATA4 S105A.

En résumé, nous avons démontré que la phosphorylation de la sérine 105 de GATA4 est nécessaire *in vivo* pour une stéroïdogénèse appropriée chez les mâles. Nos résultats apportent également des preuves que GATA4 régule la stéroïdogénèse chez la souris et

suggèrent que le même type de régulation se déroule probablement dans les cellules de Leydig humaines, hypothèse émise et soutenue depuis longtemps par notre laboratoire. Aussi, certaines questions taraudent notre curiosité. Il nous reste par exemple à défricher l'aspect mécanistique de la régulation de la stéroïdogénèse via la sérine 105 qui n'est pas une cible de PKA. Peut-on penser que la phosphorylation de la sérine 261 demeurée intacte chez les mutants *Gata4*^{S105A} est suffisante pour assurer un seuil de synthèse d'enzymes et de testostérone permettant un maintien de la stéroïdogénèse et donc de la fertilité? La caractérisation future de la lignée *Gata4*^{S261A} voir la génération d'un double mutant *Gata4*^{S105/S261A} permettront d'éclaircir et d'élargir notre connaissance sur l'importance de la phosphorylation des sérines 105 et 261 dans la fonction reproductive de GATA4. Les résultats de ce projet ont apporté un plus dans la connaissance des mécanismes de régulation de l'expression de *Gata4* in vivo notamment en ce qui concerne l'usage alternatif des exons E1A et E1B au cours du développement gonadique. Nos données, tout en améliorant notre compréhension sur l'importance de la phosphorylation dans la fonction gonadique de GATA4, ont également révélé un rôle inattendu de la sérine 105 de GATA4 dans la stéroïdogénèse chez les mâles.

Un autre facteur de transcription, SF-1 (facteur stéroïdogénique 1 ou NR5A1) membre de la famille des récepteurs nucléaires est reconnu depuis longtemps comme un régulateur clé de la stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien et dans les gonades (Tanaka *et al.*, 2007; Woodson *et al.*, 1997). Chez la souris, *SF-1* est exprimé dans le système urogénital des deux sexes autour du 9e jour embryonnaire et subit un dimorphisme sexuel à partir du jour embryonnaire E13,5 (Ikeda *et al.*, 1994). SF1 est également impliqué dans l'initiation de la différenciation des testicules au cours de la détermination du sexe puisqu'en synergie avec WT1 il interagit avec SOX9 pour réguler l'expression de l'hormone anti-müllérienne (AMH) (Parker *et al.*, 2002; Schimmer et White, 2010). Les souris *SF-1* nulles meurent juste après la naissance et n'ont pas de glandes surrénales tandis que leurs gonades dégèrent par apoptose autour du jour embryonnaire E10,5 (Luo *et al.*, 1994). Comme *GATA4*, *SF-1* régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la stéroïdogénèse notamment l'aromatase et la 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase

(Parker et Schimmer, 1997). Les souris *Gata4* nulles meurent autour du jour E9,5 à un stade précoce par rapport à celle des souris *SF-1* nulles. Il est également connu que GATA4 est important pour initier la formation de la crête génitale (Hu *et al.*, 2013a). De plus, de nombreuses études ont confirmé le rôle de GATA4 dans la formation, le développement et la fonction de plusieurs organes incluant les gonades. L'ensemble de ses données ajoutées aux résultats de nos travaux qui ont mis en évidence le rôle de GATA4 dans la stéroïdogenèse, permettent de classer GATA4 comme le régulateur majeur de la détermination du sexe et du fonctionnement des gonades en amont de SF-1.

ANNEXE : PUBLICATION SCIENTIFIQUE

An Ebox Element in the Proximal *Gata4* Promoter Is Required for *Gata4* Expression *In Vivo*

Alain Boulende Sab^{1,2}, Marie-France Bouchard², Mélanie Béland¹, Bruno Prud'homme², Ouliana Souchkova¹, Robert S. Viger^{2*}, Nicolas Pilon^{1*}

1 Molecular Genetics of Development, Department of Biological Sciences and BioMed Research Center, Faculty of Sciences, University of Quebec at Montreal (UQAM), Montreal, Quebec, Canada, **2** Reproduction, Perinatal and Child Health, CHUQ Research Centre and Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR), Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, Quebec, Canada

Abstract

GATA4 is an essential transcription factor required for the development and function of multiple tissues, including a major role in gonadogenesis. Despite its crucial role, the molecular mechanisms that regulate *Gata4* expression *in vivo* remain poorly understood. We recently found that the *Gata4* gene is expressed as multiple transcripts with distinct 5' origins. These co-expressed alternative transcripts are generated by different non-coding first exons with transcripts E1a and E1b being the most prominent. Moreover, we previously showed that an Ebox element, located in *Gata4* 5' flanking sequences upstream of exon 1a, is important for the promoter activity of these sequences in cell lines. To confirm the importance of this element *in vivo*, we generated and characterized *Gata4* Ebox knockout mice. Quantitative PCR analyses realized on gonads, heart and liver at three developmental stages (embryonic, pre-pubertal and adult) revealed that the Ebox mutation leads to a robust and specific decrease (up to 89%) of *Gata4* E1a transcript expression in all tissues and stages examined. However, a detailed characterization of the gonads revealed normal morphology and GATA4 protein levels in these mutants. Our qPCR data further indicate that this outcome is most likely due to the presence of *Gata4* E1b mRNA, whose expression levels were not decreased by the Ebox mutation. In conclusion, our work clearly confirms the importance of the proximal Ebox element and suggests that adequate GATA4 protein expression is likely protected by a compensation mechanism between *Gata4* E1a and E1b transcripts operating at the translational level.

Citation: Boulende Sab A, Bouchard M-F, Béland M, Prud'homme B, Souchkova O, et al. (2011) An Ebox Element in the Proximal *Gata4* Promoter Is Required for *Gata4* Expression *In Vivo*. PLoS ONE 6(12): e29038. doi:10.1371/journal.pone.0029038

Editor: Pierre-Antoine Defossez, Université Paris-Diderot, France

Received: September 27, 2011; **Accepted:** November 19, 2011; **Published:** December 13, 2011

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, M.H., Baker, P.J., Charlton, H.M., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., Guillou, F. et O'Shaughnessy, P.J. (2008). Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology*, 149 (7), 3279-3285.
- Achermann, J.C., Ito, M., Ito, M., Hindmarsh, P.C. et Jameson, J.L. (1999). A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nature Genetics*, 22 (2), 125-126.
- Adham, I.M. et Agoulnik, A.I. (2004). Insulin-like 3 signalling in testicular descent. *Int J Androl*, 27 (5), 257-265.
- Albrecht, K.H. et Eicher, E.M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol*, 240 (1), 92-107.
- Allard, E.K., Blanchard, K.T. et Boekelheide, K. (1996). Exogenous stem cell factor (SCF) compensates for altered endogenous SCF expression in 2,5-hexanedione-induced testicular atrophy in rats. *Biol Reprod*, 55 (1), 185-193.
- Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M. et Page, D.C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (39), 14976-14980.
- Anttonen, M., Ketola, I., Parviainen, H., Pusa, A.K. et Heikinheimo, M. (2003). FOG-2 and GATA-4 Are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression. *Biol Reprod*, 68 (4), 1333-1340.
- Arceci, R.J., King, A.A.J., Simon, M.C., Orkin, S.H. et Wilson, D.B. (1993). Mouse GATA-4: A retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Molecular and Cellular Biology*, 13 (4), 2235-2246.
- Ariyaratne, H.B.S., Mendis-Handagama, S.M.L.C., Hales, D.B. et Mason, J.I. (2000). Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biology of Reproduction*, 63 (1), 165-171.
- Asnagli, H., Afkarian, M. et Murphy, K.M. (2002). Cutting edge: Identification of an alternative GATA-3 promoter directing tissue-specific gene expression in mouse and human. *Journal of Immunology*, 168 (9), 4268-4271.

- Ayoubi, T.A. et Van De Ven, W.J. (1996). Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J*, 10 (4), 453-460. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647344>
- Baker, P.J. et O'Shaughnessy, P.J. (2001). Expression of prostaglandin D synthetase during development in the mouse testis. *Reproduction*, 122 (4), 553-559.
- Baltus, A.E., Menke, D.B., Hu, Y.C., Goodheart, M.L., Carpenter, A.E., de Rooij, D.G. et Page, D.C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet*, 38 (12), 1430-1434.
- Barboux, S., Niaudet, P., Gubler, M.C., Grünfeld, J.P., Jaubert, F., Kuttann, F., Fékété, C.N., Souleyreau-Therville, N., Thibaud, E., Fellous, M. et McElreavey, K. (1997). Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nature Genetics*, 17 (4), 467-470.
- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., Worley, K.C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E.R.B., Fraccaro, M., Zuffardi, O. et Camerino, G. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genetics*, 7 (4), 497-501.
- Barrionuevo, F., Taketo, M.M., Scherer, G. et Kispert, A. (2006). Sox9 is required for notochord maintenance in mice. *Developmental Biology*, 295 (1), 128-140.
- Behringer, R.R., Cate, R.L., Froelick, G.J., Palmiter, R.D. et Brinster, R.L. (1990). Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature*, 345 (6271), 167-170.
- Belaguli, N.S., Zhang, M., Garcia, A.H. et Berger, D.H. (2012). PIAS1 is a GATA4 SUMO ligase that regulates GATA4-dependent intestinal promoters independent of SUMO ligase activity and GATA4 sumoylation. *PLoS One*, 7 (4), e35717.
- Bellve, A.R., Millette, C.F., Bhatnagar, Y.M. et O'Brien, D.A. (1977). Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J Histochem Cytochem*, 25 (7), 480-494.
- Bennett, J., Baumgarten, S.C. et Stocco, C. (2013). GATA4 and GATA6 silencing in ovarian granulosa cells affects levels of mRNAs involved in steroidogenesis, extracellular structure organization, IGF-I activity, and apoptosis. *Endocrinology*, 154 (12), 4845-4858.
- Bennett, J., Wu, Y.G., Gossen, J., Zhou, P. et Stocco, C. (2012). Loss of GATA-6 and GATA-4 in granulosa cells blocks folliculogenesis, ovulation, and follicle stimulating hormone receptor expression leading to female infertility. *Endocrinology*, 153 (5), 2474-2485.

- Bergeron, F., Nadeau, G. et Viger, R.S. (2015). GATA4 knockdown in MA-10 Leydig cells identifies multiple target genes in the steroidogenic pathway. *Reproduction*, 149 (3), 245-257.
- Bernard, P., Sim, H., Knowler, K., Vilain, E. et Harley, V. (2008). Human SRY inhibits β -catenin-mediated transcription. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40 (12), 2889-2900.
- Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N. et Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348 (6300), 448-450.
- Bhardwaj, A., Rao, M.K., Kaur, R., Buttigieg, M.R. et Wilkinson, M.F. (2008). GATA factors and androgen receptor collaborate to transcriptionally activate the Rhox5 homeobox gene in sertoli cells. *Molecular and Cellular Biology*, 28 (7), 2138-2153.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. et De Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22 (1), 85-89.
- Biason-Lauber, A. (2010). Control of sex development. [Review]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24 (2), 163-186.
- Binnerts, M.E., Kim, K.A., Bright, J.M., Patel, S.M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J.M., Liu, Y., Lomas Iii, W.E., Dixon, M., Hazell, S.A., Wagle, M., Nie, W.S., Tomasevic, N., Williams, J., Zhan, X., Levy, M.D., Funk, W.D. et Abo, A. (2007). R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (37), 14700-14705.
- Birk, O.S., Caslano, D.E., Wassif, C.A., Cogilat, T., Zhaos, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J.A., Parker, K.L., Porter, F.D. et Westphal, H. (2000). The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature*, 403 (6772), 909-913.
- Bishop, C.E., Whitworth, D.J., Qin, Y., Agoulnik, A.I., Agoulnik, I.U., Harrison, W.R., Behringer, R.R. et Overbeek, P.A. (2000). A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nature Genetics*, 26 (4), 490-494.
- Blobel, G.A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M. et Orkin, S.H. (1998). CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (5), 2061-2066.

- Borum, K. (1961). Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res*, 24, 495-507.
- Boulende Sab, A., Bouchard, M.F., Beland, M., Prud'homme, B., Souchkova, O., Viger, R.S. et Pilon, N. (2011). An Ebox element in the proximal Gata4 promoter is required for Gata4 expression in vivo. *PLoS One*, 6 (12), e29038.
- Bowles, J., Feng, C.W., Spiller, C., Davidson, T.L., Jackson, A. et Koopman, P. (2010). FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Developmental Cell*, 19 (3), 440-449.
- Brennan, J. et Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet*, 5 (7), 509-521.
- Brennan, J., Tilmann, C. et Capel, B. (2003). Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev*, 17(6), 800-810.
- Brewer, A., Gove, C., Davies, A., McNulty, C., Barrow, D., Koutsourakis, M., Farzaneh, F., Pizzey, J., Bomford, A. et Patient, R. (1999). The human and mouse GATA-6 genes utilize two promoters and two initiation codons. *J Biol Chem*, 274 (53), 38004-38016.
- Bullejos, M. et Koopman, P. (2004). Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Mol Reprod Dev*, 68 (4), 422-428.
- Burch, J.B. (2005). Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. *Cell Dev Biol*, 16 (1), 71-81.
- Burger, H.G. et Robertson, D.M. (1997). Editorial: inhibin in the male--progress at last. *Endocrinology*, 138 (4), 1361-1362.
- Buscara, L., Montazer-Torbati, F., Chadi, S., Auguste, A., Laubier, J., Chassot, A.A., Renault, L., Passet, B., Costa, J., Pannetier, M., Vilotte, M., Chaboissier, M.C., Vilotte, J.L., Pailhoux, E. et le Provost, F. (2009). Goat RSPO1 over-expression rescues sex-reversal in Rspo1-knockout XX mice but does not perturb testis differentiation in XY or sex-reversed XX mice. *Transgenic Research*, 18 (4), 649-654.
- Bushnik, T., Cook, J., Hughes, E. et Tough, S. (2012). Seeking medical help to conceive. *Health reports / Statistics Canada, Canadian Centre for Health Information = Rapports sur la santé / Statistique Canada, Centre canadien d'information sur la santé*, 23 (4), 7-13.

- Byskov, A.G. (1975). The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *J Reprod Fertil*, 45 (2), 201-209.
- Byskov, A.G. (1978). The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biol Reprod*, 19 (4), 720-735.
- Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeager, H., Lewis, W.H., Jones, C. et Housman, D.E. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, 60 (3), 509-520.
- Campbell, C.E., Huang, A., Gurney, A.L., Kessler, P.M., Hewitt, J.A. et Williams, B.R.G. (1994). Antisense transcripts and protein binding motifs within the Wilms tumour (WT1) locus. *Oncogene*, 9 (2), 583-595.
- Cantor, A.B. et Orkin, S.H. (2005). Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16 (1), 117-128.
- Capel, B. (2006). R-spondin1 tips the balance in sex determination. *Nature Genetics*, 38 (11), 1233-1234.
- Capel, B., Swain, A., Nicolis, S., Hacker, A., Walter, M., Koopman, P., Goodfellow, P. et Lovell-Badge, R. (1993). Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell*, 73 (5), 1019-1030.
- Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B. et Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1.
- Carroll, R.S., Kowash, P.M., Lofgren, J.A., Schwall, R.H. et Chin, W.W. (1991). *In vivo* regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology*, 129 (6): 3299-304.
- Cass, L.A., Summers, S.A., Prendergast, G.V., Backer, J.M., Birnbaum, M.J. et Meinkoth, J.L. (1999). Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol Cell Biol*, 19 (9), 5882-5891.
- Cate, R.L., Ninfa, E.G., Pratt, D.J., MacLaughlin, D.T. et Donahoe, P.K. (1986). Development of Mullerian inhibiting substance as an anti-cancer drug. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 (1), 641-647.
- Chaboissier, M.C., Kobayashi, A., Vidal, V.I.P., Lützkendorf, S., van de Kant, H.J.G., Wegner, M., de Rooij, D.G., Behringer, R.R. et Schedl, A. (2004). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development*, 131 (9), 1891-1901.

- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L. et Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450(7173), 1230-1234.
- Chan, H.M. et La Thangue, N.B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of Cell Science*, 114 (13), 2363-2373.
- Charron, F. et Nemer, M. (1999). GATA transcription factors and cardiac development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 10 (1), 85-91.
- Charron, F., Tsimiklis, G., Arcand, M., Robitaille, L., Liang, Q., Molkenin, J.D., Meloche, S. et Nemer, M. (2001). Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev*, 15 (20), 2702-2719.
- Chassot, A.A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A. et Chaboissier, M.C. (2008). Activation of β -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Human Molecular Genetics*, 17 (9), 1264-1277.
- Chauchereau, A., Amazit, L., Quesne, M., Guiochon-Mantel, A. et Milgrom, E. (2003). Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (14), 12335-12343.
- Chun, T.H., Itoh, H., Subramanian, L., Iñiguez-Lluhí, J.A. et Nakao, K. (2003). Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy. *Circulation Research*, 92 (11), 1201-1208.
- Ciechanover, A. et Ben-Saadon, R. (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol*, 14 (3), 103-106.
- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H. et Hershko, A. (1982). "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 257 (5), 2537-2542.
- Ciechanover, A. et Iwai, K. (2004). The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life*, 56 (4), 193-201.
- Clark, B.J., Soo, S.C., Caron, K.M., Ikeda, Y., Parker, K.L. et Stocco, D.M. (1995). Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Molecular Endocrinology*, 9 (10), 1346-1355.
- Clemens, J.W., Lala, D.S., Parker, K.L. et Richards, J.S. (1994). Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 134 (3), 1499-1508.

- Collavin, L., Gostissa, M., Avolio, F., Secco, P., Ronchi, A., Santoro, C. et Del Sal, G. (2004). Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (24), 8870-8875.
- Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B. et Ornitz, D.M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, 104 (6), 875-889.
- Corre, S. et Galibert, M.D. (2006). USF as a key regulatory element of gene expression. *USF: Un régulateur essentiel de la transcription*, 22 (1), 62-67.
- Correa, R.V., Domenice, S., Bingham, N.C., Billerbeck, A.E.C., Rainey, W.E., Parker, K.L. et Mendonca, B.B. (2004). A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89 (4), 1767-1772.
- Crispino, J.D., Lodish, M.B., Thurberg, B.L., Litovsky, S.H., Collins, T., Molkentin, J.D. et Orkin, S.H. (2001). Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev*, 15 (7), 839-844.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Serafina Ristaldi, M., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A. et Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*, 27 (2), 159-166.
- Crocker, M., Coghill, S.B. et Cortinho, R. (1988). An unbalanced autosomal translocation (7;9) associated with feminization. *Clinical Genetics*, 34 (1), 70-73.
- Cunningham, G.R. et Huckins, C. (1979). Persistence of complete spermatogenesis in the presence of low intratesticular concentrations of testosterone. *Endocrinology*, 105 (1), 177-186.
- Dai, Y.S. et Markham, B.E. (2001). p300 Functions as a Coactivator of Transcription Factor GATA-4. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (40), 37178-37185.
- Dalosso, A.R., Hancock, A.L., Brown, K.W., Williams, A.C., Jackson, S. et Malik, K. (2004). Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilm's tumours. *Human Molecular Genetics*, 13 (4), 405-415.
- Dasen, J.S., O'Connell, S.M., Flynn, S.E., Treier, M., Gleiberman, A.S., Szeto, D.P., Hooshmand, F., Aggarwal, A.K. et Rosenfeld, M.G. (1999). Reciprocal

- interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*, 97 (5), 587-598.
- De Grandi, A., Calvari, V., Bertini, V., Bulfone, A., Peverali, G., Camerino, G., Borsani, G. et Guioli, S. (2000). The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mechanisms of Development*, 90 (2), 323-326.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. et Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 396 (6710), 474-477.
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F. et Berta, P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Molecular and Cellular Biology*, 18 (11), 6653-6665.
- De Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F. et Berta, P. (2000). Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Developmental Dynamics*, 217 (3), 293-298.
- Denolet, E., De Gendt, K., Allemeersch, J., Engelen, K., Marchal, K., Van Hummelen, P., Tan, K.A.L., Sharpe, R.M., Saunders, P.T.K., Swinnen, J.V. et Verhoeven, G. (2006). The effect of a Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Molecular Endocrinology*, 20 (2), 321-334.
- Desterro, J.M.P., Rodriguez, M.S. et Hay, R.T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Molecular Cell*, 2 (2), 233-239.
- Dharia, S., Slane, A., Jian, M., Conner, M., Conley, A.J. et Parker Jr, C.R. (2004). Colocalization of P450c17 and cytochrome b5 in androgen-synthesizing tissues of the human. *Biology of Reproduction*, 71 (1), 83-88.
- DiNapoli, L., Batchvarov, J. et Capel, B. (2006). FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development*, 133 (8), 1519-1527.
- Divine, J.K., Staloch, L.J., Haveri, H., Jacobsen, C.M., Wilson, D.B., Heikinheimo, M. et Simon, T.C. (2004). GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1 α . *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287 (5 50-5), G1086-G1099.
- Dufau, M. L (1988). Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu Rev Physiol*, 50: 483-508.

- Dyer, C.A. et Erickson, G.F. (1985). Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology*, 116 (4), 1645-1652.
- Eacker, S.M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H.L., Gong, E.Y., Lee, K. et Braun, R.E. (2008). Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Molecular Endocrinology*, 22 (3), 623-635.
- Edson, M.A., Nagaraja, A.K. et Matzuk, M.M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*, 30 (6), 624-712.
- Efimenko, E., Padua, M.B., Manuylov, N.L., Fox, S.C., Morse, D.A. et Tevosian, S.G. (2013). The transcription factor GATA4 is required for follicular development and normal ovarian function. *Dev Biol*, 381 (1), 144-158.
- Emmerich, C.H., Schmukle, A.C. et Walczak, H. (2011). The emerging role of linear ubiquitination in cell signaling. *Science Signaling*, 4 (204).
- Englert, C. (1998). WT1 - More than a transcription factor? *Trends in Biochemical Sciences*, 23 (10), 389-393.
- Evans, T. (1997). Regulation of cardiac gene expression by GATA-4/5/6. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 7 (3), 75-83.
- Evans, T. et Felsenfeld, G. (1989). The erythroid-specific transcription factor Eryf1: A new finger protein. *Cell*, 58 (5), 877-885.
- Feng, S., Bogatcheva, N.V., Kamat, A.A. et Agoulnik, A.I. (2005). Genetic targeting of relaxin and insl3 signaling in mice. *Ann NY Acad Sci*, 1041, 82-90.
- Fitzpatrick, S.L. et Richards, J.S. (1993). Regulation of the rat aromatase gene in ovarian granulosa cells and R2C Leydig cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 44 (4-6), 429-433.
- Flück, C.E. et Miller, W.L. (2004). GATA-4 and GATA-6 modulate tissue-specific transcription of the human gene for P450c17 by direct interaction with Sp1. *Molecular Endocrinology*, 18 (5), 1144-1157.
- Fossett, N., Tevosian, S.G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S.H. et Schulz, R.A. (2001). The friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (13), 7342-7347.
- Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanović, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., Goodfellow, P.N., Brook, J.D. et

- Schafer, A.J. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, 372 (6506), 525-530.
- Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C. et Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (22), 12355-12358.
- Fürbass, R., Tomek, W. et Vanselow, J. (2010). Upstream Stimulating Factors 1 and 2 Enhance Transcription from the Placenta-Specific Promoter 1.1 of the Bovine Cyp19 Gene. *BMC Molecular Biology*, 11.
- Gaines, P., Geiger, J.N., Knudsen, G., Seshasayee, D. et Wojchowski, D.M. (2000). GATA-1- and FOG-dependent activation of megakaryocytic α IIB gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (44), 34114-34121.
- Gao, F., Maiti, S., Alam, N., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., Lécureuil, C., Guillou, F. et Huff, V. (2006). The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (32), 11987-11992.
- Ge, Y.C., Li, J.N., Ni, X.T., Guo, C.M., Wang, W.S., Duan, T. et Sun, K. (2011). Cross talk between cAMP and p38 MAPK pathways in the induction of leptin by hCG in human placental syncytiotrophoblasts. *Reproduction*, 142(2), 369-375.
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R.L., Orkin, S.H. et Bruns, G.A.P. (1990). Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*, 343 (6260), 774-778.
- Gingold, H. et Pilpel, Y. (2011). Determinants of translation efficiency and accuracy. *Molecular Systems Biology*, 7.
- Ginsburg, M., Snow, M.H. et McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110 (2), 521-528.
- Gloerich, M. et Bos, J.L. (2010). Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 355-375.
- Gordon, D.F., Lewis, S.R., Haugen, B.R., James, R.A., McDermott, M.T., Wood, W.M. et Ridgway, E.C. (1997). Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter. *J Biol Chem*, 272 (39), 24339-24347.
- Gregory, S.J. et Kaiser, U.B. (2004). Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Reprod Med*, 22 (3): 253-67.

- Griswold, M. D (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell Dev Bio*, 9 (4): 411-6.
- Gubbay, J., Koopman, P., Collignon, J., Burgoyne, P. et Lovell-Badge, R. (1990). Normal structure and expression of Zfy genes in XY female mice mutant in Tdy. *Development*, 109 (3), 647-653.
- Haber, D.A., Sohn, R.L., Buckler, A.J., Pelletier, J., Call, K.M. et Housman, D.E. (1991). Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor erene WT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (21), 9618-9622.
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. et Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*, 121 (6), 1603-1614.
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P. et Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol*, 5 (5), 461-466.
- Haider, S.G., Laue, D., Schwochau, G. et Hilscher, B. (1995). Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 100 Suppl 1, 535-541.
- Haider, S.G. et Servos, G. (1998). Ultracytochemistry of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anatomy and Embryology*, 198 (2), 101-110.
- Halvorson, L.M., Ito, M., Jameson, J.L. et Chin, W.W. (1998). Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate luteinizing hormone β -subunit gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (24), 14712-14720.
- Hammes, A., Guo, J.K., Lutsch, G., Leheste, J.R., Landrock, D., Ziegler, U., Gubler, M.C. et Schedl, A. (2001). Two splice variants of the wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*, 106 (3), 319-329.
- Harley, V.R., Layfield, S., Mitchell, C.L., Forwood, J.K., John, A.P., Briggs, L.J., McDowall, S.G. et Jans, D.A. (2003). Defective importin β recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (12), 7045-7050.

- Hayakawa, F., Towatari, M., Ozawa, Y., Tomita, A., Privalsky, M.L. et Saito, H. (2004). Functional regulation of GATA-2 by acetylation. *Journal of Leukocyte Biology*, 75 (3), 529-540.
- He, C.Z. et Burch, J.B. (1997). The chicken GATA-6 locus contains multiple control regions that confer distinct patterns of heart region-specific expression in transgenic mouse embryos. *J Biol Chem*, 272 (45), 28550-28556.
- Heicklen-Klein, A. et Evans, T. (2004). T-box binding sites are required for activity of a cardiac GATA-4 enhancer. *Developmental Biology*, 267 (2), 490-504.
- Heikinheimo, M., Ermolaeva, M., Bielinska, M., Rahman, N.A., Narita, N., Huhtaniemi, I.T., Tapanainen, J.S. et Wilson, D.B. (1997). Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology*, 138 (8), 3505-3514.
- Heikinheimo, M., Scandrett, J.M. et Wilson, D.B. (1994). Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Developmental Biology*, 164 (2), 361-373.
- Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H. et Boyes, J. (2006). Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *EMBO Journal*, 25 (14), 3264-3274.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. et Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 258 (13), 8206-8214.
- Hiramatsu, R., Matoba, S., Kanai-Azuma, M., Tsunekawa, N., Katoh-Fukui, Y., Kurohmaru, M., Morohashi, K.I., Wilhelm, D., Koopman, P. et Kanai, Y. (2009). A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development*, 136 (1), 129-138.
- Hiroi, H., Christenson, L.K., Chang, L., Sammel, M.D., Berger, S.L. et Strauss Iii, J.F. (2004). Temporal and spatial changes in transcription factor binding and histone modifications at the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) locus associated with StAR transcription. *Molecular Endocrinology*, 18 (4), 791-806.
- Hiroi, H., Christenson, L.K. et Strauss Iii, J.F. (2004). Regulation of transcription of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: Temporal and spatial changes in transcription factor binding and histone modification. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215 (1-2), 119-126.
- Hirshfield, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124, 43-101.

- Honda, A., Hirose, M., Hara, K., Matoba, S., Inoue, K., Miki, H., Hiura, H., Kanatsu-Shinohara, M., Kanai, Y., Kono, T., Shinohara, T. et Ogura, A. (2007). Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (30), 12389-12394.
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M., Park-Sarge, O.K. et Sarge, K.D. (2001). Regulation of Heat Shock Transcription Factor 1 by Stress-induced SUMO-1 Modification. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (43), 40263-40267.
- Hossain, A. et Saunders, G.F. (2001). The Human Sex-determining Gene SRY Is a Direct Target of WT1. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (20), 16817-16823.
- Hossain, A. et Saunders, G.F. (2003). Role of Wilms Tumor 1 (WT1) in the Transcriptional Regulation of the Mullerian-Inhibiting Substance Promoter. *Biology of Reproduction*, 69 (6), 1808-1814.
- Hoyle, C., Narvaez, V., Alldus, G., Lovell-Badge, R. et Swain, A. (2002). Dax1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. *Molecular Endocrinology*, 16 (4), 747-756.
- Hu, Y.C., Okumura, L.M. et Page, D.C. (2013a). Gata4 Is Required for Formation of the Genital Ridge in Mice. *PLoS Genetics*, 9 (7).
- Hu, Y.C., Okumura, L.M. et Page, D.C. (2013b). Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genet*, 9 (7), e1003629.
- Huang, H.F. et Nieschlag, E. (1986). Suppression of the intratesticular testosterone is associated with quantitative changes in spermatogonial populations in intact adult rats. *Endocrinology*, 118 (2), 619-627.
- Huckins, C. et Clermont, Y. (1968). Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. *Arch Anat Histol Embryol*, 51(1), 341-354. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4905275>
- Huhtaniemi, I. et Pelliniemi, L.J. (1992). Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med*, 201 (2), 125-140.
- Ikeda, Y., Lala, D.S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M.P. et Parker, K.L. (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Molecular Endocrinology*, 7 (7), 852-860.
- Ikeda, Y., Shen, W.H., Ingraham, H.A. et Parker, K.L. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology*, 8 (5), 654-662.

- Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T.J., Hentges, K.E., Zanaria, E., Lalli, E., Tamai, K.T., Sassone-Corsi, P., Lovell-Badge, R., Camerino, G. et Parker, K.L. (1996). Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: Potential links in endocrine development. *Molecular Endocrinology*, 10 (10), 1261-1272.
- Ikeda, Y., Takeda, Y., Shikayama, T., Mukai, T., Hisano, S. et Morohashi, K.I. (2001). Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Developmental Dynamics*, 220 (4), 363-376.
- Ishibashi, T., Yokura, Y., Ohashi, K., Yamamoto, H. et Maeda, M. (2011). Conserved GC-boxes, E-box and GATA motif are essential for GATA-4 gene expression in P19CL6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413 (2), 171-175.
- Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J.D. et Yamamoto, M. (1993). Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature*, 362 (6419), 466-468.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B. et Alessi, D.R. (1996). Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J*, 315 (Pt 3), 709-713.
- Jeays-Ward, K., Hoyle, C., Brennan, J., Dandonneau, M., Alldus, G., Capel, B. et Swain, A. (2003). Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*, 130 (16), 3663-3670.
- Jeske, Y.W.A., Bowles, J., Greenfield, A. et Koopman, P. (1995). Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nature Genetics*, 10 (4), 480-482.
- Johnston, H., Baker, P.J., Abel, M., Charlton, H.M., Jackson, G., Fleming, L., Kumar, T.R. et O'Shaughnessy, P.J. (2004). Regulation of Sertoli Cell Number and Activity by Follicle-Stimulating Hormone and Androgen during Postnatal Development in the Mouse. *Endocrinology*, 145 (1), 318-329.
- Jordan, B.K., Mohammed, M., Ching, S.T., Délot, E., Chen, X.N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P.N., Elejalde, B.R. et Vilain, E. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics*, 68 (5), 1102-1109.
- Jorgensen, J.S. et Gao, L. (2005). Irx3 is differentially up-regulated in female gonads during sex determination. *Gene Expression Patterns*, 5 (6), 756-762.

- Josso, N., Picard, J.Y., Rey, R. et Di Clemente, N. (2006). Testicular anti-Müllerian hormone: History, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 3 (4), 347-358.
- Jost, A. (1954). Hormonal factors in the development of the fetus. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 19, 167-181.
- Jun, J.H., Shim, J.K., Ryoo, H.M. et Kwak, Y.L. (2013). Erythropoietin-activated ERK/MAP kinase enhances GATA-4 acetylation via phosphorylation of serine 261 of GATA-4. *Journal of Cellular Physiology*, 228 (1), 190-197.
- Jun, J.H., Shin, E.J., Kim, J.H., Kim, S.O., Shim, J.K. et Kwak, Y.L. (2013). Erythropoietin prevents hypoxia-induced GATA-4 ubiquitination via phosphorylation of serine 105 of GATA-4. *Biol Pharm Bull*, 36 (7), 1126-1133.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A. et Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cell*, 113 (1), 127-137.
- Kamata, T., Katsube, K.I., Michikawa, M., Yamada, M., Takada, S. et Mizusawa, H. (2004). R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1676 (1), 51-62.
- Karl, J. et Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol*, 203 (2), 323-333.
- Kashimada, K. et Koopman, P. (2010). Sry: The master switch in mammalian sex determination. *Development*, 137 (23), 3921-3930.
- Katz, S.G., Williams, A., Yang, J., Fujiwara, Y., Tsang, A.P., Epstein, J.A. et Orkin, S.H. (2003). Endothelial lineage-mediated loss of the GATA cofactor Friend of GATA 1 impairs cardiac development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (SUPPL. 2), 14030-14035.
- Kawabe, K., Shikayama, T., Tsuboi, H., Oka, S., Oba, K., Yanase, T., Nawata, H. et Morohashi, K.I. (1999). Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. *Molecular Endocrinology*, 13 (8), 1267-1284.
- Kawamura, T., Ono, K., Morimoto, T., Wada, H., Hirai, M., Hidaka, K., Morisaki, T., Heike, T., Nakahata, T., Kita, T. et Hasegawa, K. (2005). Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (20), 19682-19688.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. et Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1.

Science, 282 (5397), 2275-2279.

- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Scholer, H.R. et Tomilin, A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep*, 5 (11), 1078-1083.
- Kelley, C., Blumberg, H., Zon, L.I. et Evans, T. (1993). GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development*, 118 (3), 817-827.
- Ketola, I., Anttonen, M., Vaskivuo, T., Tapanainen, J.S., Toppari, J. et Heikinheimo, M. (2002). Developmental expression and spermatogenic stage specificity of transcription factors GATA-1 and GATA-4 and their cofactors FOG-1 and FOG-2 in the mouse testis. *Eur J Endocrinol*, 147 (3), 397-406.
- Ketola, I., Pentikainen, V., Vaskivuo, T., Ilvesmaki, V., Herva, R., Dunkel, L., Tapanainen, J.S., Toppari, J. et Heikinheimo, M. (2000). Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (10), 3925-3931.
- Ketola, I., Rahman, N., Toppari, J., Bielinska, M., Porter-Tinge, S.B., Tapanainen, J.S., Huhtaniemi, I.T., Wilson, D.B. et Heikinheimo, M. (1999). Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology*, 140 (3), 1470-1480.
- Ketola, I., Toppari, J., Vaskivuo, T., Herva, R., Tapanainen, J.S. et Heikinheimo, M. (2003). Transcription factor GATA-6, cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax in human fetal testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88 (4), 1858-1865.
- Kiiveri, S., Liu, J., Westerholm-Ormio, M., Narita, N., Wilson, D.B., Voutilainen, R. et Heikinheimo, M. (2002). Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue. *Endocrinology*, 143 (8), 3136-3143.
- Kim, J., Prawitt, D., Bardeesy, N., Torban, E., Vicaner, C., Goodyer, P., Zabel, B. et Pelletier, J. (1999). The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (3), 2289-2299.
- Kim, K.A., Wagle, M., Tran, K., Zhan, X., Dixon, M.A., Liu, S., Gros, D., Korver, W., Yonkovich, S., Tomasevic, N., Binnerts, M. et Abo, A. (2008). R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, 19 (6), 2588-2596.

- Kim, S., Bardwell, V.J. et Zarkower, D. (2007). Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation. *Developmental Biology*, 307 (2), 314-327.
- Kim, Y., Bingham, N., Sekido, R., Parker, K.L., Lovell-Badge, R. et Capel, B. (2007). Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (42), 16558-16563.
- Kim, Y. et Capel, B. (2006). Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: A new perspective on an old problem. *Developmental Dynamics*, 235 (9), 2292-2300.
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R. et Capel, B. (2006a). Fgf9 and Wnt4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS Biology*, 4 (6).
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R. et Capel, B. (2006b). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biology*, 4 (6), 1000-1009.
- Klamt, B., Koziell, A., Poulat, F., Wieacker, P., Scambler, P., Berta, P. et Gessler, M. (1998). Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Human Molecular Genetics*, 7 (4), 709-714.
- Ko, L.J., Yamamoto, M., Leonard, M.W., George, K.M., Ting, P. et Engel, J.D. (1991). Murine and Human T-Lymphocyte GATA-3 Factors Mediate Transcription through a cis-Regulatory Element within the Human T-Cell Receptor δ Gene Enhancer. *Molecular and Cellular Biology*, 11 (5), 2778-2784.
- Koga, S., Yamaguchi, N., Abe, T., Minegishi, M., Tsuchiya, S., Yamamoto, M. et Minegishi, N. (2007). Cell-cycle-dependent oscillation of GATA2 expression in hematopoietic cells. *Blood*, 109 (10), 4200-4208.
- Köhler, B., Lin, L., Ferraz-de-Souza, B., Wieacker, P., Heidemann, P., Schröder, V., Biebermann, H., Schnabel, D., Grüters, A. et Achermann, J.C. (2008). Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Human Mutation*, 29 (1), 59-64.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, 37 (Pt 5), 937-953.

- Komatsu, T., Mizusaki, H., Mukai, T., Ogawa, H., Baba, D., Shirakawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Yamamoto, H., Kikuchi, A. et Morohashi, K.I. (2004). Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Molecular Endocrinology*, 18 (10), 2451-2462.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. et Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351 (6322), 117-121.
- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. et Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348 (6300), 450-452.
- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R. et Grosveld, F. (1999). The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development (Cambridge, England)*, 126 (9), 723-732.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. et Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74 (4), 679-691.
- Kucinskas, L. et Just, W. (2005). Human male sex determination and sexual differentiation: pathways, molecular interactions and genetic disorders. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 41 (8), 633-640.
- Kudla, G., Murray, A.W., Tollervey, D. et Plotkin, J.B. (2009). Coding-sequence determinants of expression in escherichia coli. *Science*, 324 (5924), 255-258.
- Kuo, C.T., Morrisey, E.E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M.M., Parmacek, M.S., Soudais, C. et Leiden, J.M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*, 11 (8), 1048-1060.
- Kusaka, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Miyabayashi, K., Baba, T., Shima, Y., Sugiyama, N., Sugimoto, Y., Okuno, Y., Kodama, R., Iizuka-Kogo, A., Senda, T., Sasaoka, T., Kitamura, K., Aizawa, S. et Morohashi, K.I. (2010). Abnormal epithelial cell polarity and ectopic Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression induced in Emx2 KO Embryonic Gonads. *Endocrinology*, 151 (12), 5893-5904.
- Kyronlahti, A., Euler, R., Bielinska, M., Schoeller, E.L., Moley, K.H., Toppari, J., Heikinheimo, M. et Wilson, D.B. (2011). GATA4 regulates Sertoli cell function and fertility in adult male mice. *Mol Cell Endocrinol*, 333 (1), 85-95.

- Kyrönlahti, A., Vetter, M., Euler, R., Bielinska, M., Jay, P.Y., Anttonen, M., Heikinheimo, M. et Wilson, D.B. (2011). GATA4 deficiency impairs ovarian function in adult mice. *Biology of Reproduction*, 84 (5), 1033-1044.
- Laitinen, M.P., Anttonen, M., Ketola, I., Wilson, D.B., Ritvos, O., Butzow, R. et Heikinheimo, M. (2000). Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (9), 3476-3483.
- Laity, J.H., Dyson, H.J. et Wright, P.E. (2000). Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (22), 11932-11935.
- Lala, D.S., Rice, D.A. et Parker, K.L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Molecular Endocrinology*, 6 (8), 1249-1258.
- Laverriere, A.C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B.E. et Evans, T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (37), 23177-23184.
- LaVoie, H.A. (2003). The role of GATA in mammalian reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228 (11), 1282-1290.
- Lavoie, H.A., McCoy, G.L. et Blake, C.A. (2004). Expression of the GATA-4 and GATA-6 transcription factors in the fetal rat gonad and in the ovary during postnatal development and pregnancy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 227 (1-2), 31-40.
- Lawson, K.A. et Pedersen, R.A. (1992). Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. *Ciba Found Symp*, 165, 3-21; discussion 21-26.
- Lee, M.E., Temizer, D.H., Clifford, J.A. et Quertermous, T. (1991). Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (24), 16188-16192.
- Leers-Sucheta, S., Morohashi, K.I., Mason, J.I. et Melner, M.H. (1997). Synergistic activation of the human type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (12), 7960-7967.

- Legro, R.S. et Strauss Iii, J.F. (2002). Molecular progress in infertility: Polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 78 (3), 569-576.
- Lei, N. et Heckert, L.L. (2004). Gata4 Regulates Testis Expression of Dmrt1. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (1), 377-388.
- Lejeune, H., Habert, R. et Saez, J.M. (1998). Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *J Mol Endocrinol*, 20 (1), 1-25.
- Levros, L.C., Carmo, S.D., Edouard, E., Legault, P., Charfi, C. et Rassart, E. (2010). Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: Implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1803 (9), 1062-1071.
- Liang, Q., Wiese, R.J., Bueno, O.F., Dai, Y.S., Markham, B.E. et Molkenin, J.D. (2001). The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*, 21 (21), 7460-7469.
- Lin, A.C., Roche, A.E., Wilk, J. et Svensson, E.C. (2004). The N termini of Friend of GATA (FOG) proteins define a novel transcriptional repression motif and a superfamily of transcriptional repressors. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (53), 55017-55023.
- Lin, L. et Achermann, J.C. (2008). Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sexual Development*, 2 (4-5), 200-209.
- Lin, X., Liang, M., Liang, Y.Y., Brunicardi, F.C. et Feng, X.H. (2003). SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (33), 31043-31048.
- Lindeboom, F., Gillemans, N., Karis, A., Jaegle, M., Meijer, D., Grosveld, F. et Philipsen, S. (2003). A tissue-specific knockout reveals that Gata1 is not essential for Sertoli cell function in the mouse. *Nucleic Acids Res*, 31(18), 5405-5412.
- Liu, C.F., Bingham, N., Parker, K. et Yao, H.H.C. (2009). Sex-specific roles of β -catenin in mouse gonadal development. *Human Molecular Genetics*, 18 (3), 405-417.
- Liu, C.F., Liu, C. et Yao, H.H.C. (2010) Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. : *Vol. 90. Current Topics in Developmental Biology* (pp. 263-290).
- Liu, C.F., Parker, K. et Humphrey, Y. (2010). WNT4/ β -catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin β B in the mouse fetal ovary. *PLoS ONE*, 5 (4).

- Lowry, J.A. et Atchley, W.R. (2000). Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: Conservation within the DNA-binding domain. *Journal of Molecular Evolution*, 50 (2), 103-115.
- Lu, J.R., McKinsey, T.A., Xu, H., Wang, D.Z., Richardson, J.A. et Olson, E.N. (1999). FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (6), 4495-4502.
- Ludbrook, L.M. et Harley, V.R. (2004). Sex determination: A 'window' of DAX1 activity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15 (3), 116-121.
- Luo, X., Ikeda, Y. et Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77 (4), 481-490.
- Luo, X., Ikeda, Y., Schlosser, D.A. et Parker, K.L. (1995). Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse Fzf-F1 gene. *Molecular Endocrinology*, 9(9), 1233-1239.
- Luu-The, V., Dufort, I., Pelletier, G. et Labrie, F. (2001). Type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Its role in the formation of androgens in women. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171 (1-2), 77-82.
- Lynch, J.P., Lala, D.S., Peluso, J.J., Luo, W., Parker, K.L. et White, B.A. (1993). Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Molecular Endocrinology*, 7 (6), 776-786.
- Lyon, M.F., Glenister, P.H. et Lynn Lamoreux, M. (1975). Normal spermatozoa from androgen resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature*, 258 (5536), 620-622.
- MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P. et Petkovich, M. (2007). Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology*, 148 (10), 4560-4567.
- Magoffin, D.A. (2005). Ovarian theca cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37 (7), 1344-1349.
- Maneechotesuwan, K., Xin, Y., Ito, K., Jazrawi, E., Lee, K.Y., Usmani, O.S., Barnes, P.J. et Adcock, I.M. (2007). Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *Journal of Immunology*, 178 (4), 2491-2498.
- Manna, P.R., Dyson, M.T. et Stocco, D.M. (2009). Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod*, 15 (6), 321-333.

- Manning, B.D. et Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129 (7), 1261-1274.
- Manuylov, N.L., Fujiwara, Y., Adameyko, I.I., Poulat, F. et Tevosian, S.G. (2007). The regulation of Sox9 gene expression by the GATA4/FOG2 transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models. *Developmental Biology*, 307 (2), 356-367.
- Manuylov, N.L., Smagulova, F.O., Leach, L. et Tevosian, S.G. (2008). Ovarian development in mice requires the GATA4-FOG2 transcription complex. *Development*, 135 (22), 3731-3743.
- Manuylov, N.L., Smagulova, F.O. et Tevosian, S.G. (2007). Fog2 excision in mice leads to premature mammary gland involution and reduced Esr1 gene expression. *Oncogene*, 26 (36), 5204-5213.
- Manuylov, N.L., Zhou, B., Ma, Q., Fox, S.C., Pu, W.T. et Tevosian, S.G. (2011). Conditional ablation of Gata4 and Fog2 genes in mice reveals their distinct roles in mammalian sexual differentiation. *Dev Biol*, 353 (2), 229-241.
- Martin, L.J., Bergeron, F., Viger, R.S. et Tremblay, J.J. (2012). Functional cooperation between GATA factors and cJUN on the star promoter in MA-10 leydig cells. *Journal of Andrology*, 33 (1), 81-87.
- Martin, L.J., Taniguchi, H., Robert, N.M., Simard, J., Tremblay, J.J. et Viger, R.S. (2005). GATA factors and the nuclear receptors, steroidogenic factor 1/liver receptor homolog 1, are key mutual partners in the regulation of the human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 promoter. *Molecular Endocrinology*, 19 (9), 2358-2370.
- Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R. et Capel, B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol*, 7 (12), 958-968.
- Martinerie, L., Bouvattier, C. et Lombes, M. (2009). SF-1, a key player in adrenal and gonadal differentiation: implications in gonadal dysgenesis and primary ovarian insufficiency. *Annales d'endocrinologie*, 70 Suppl 1, S26-32.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J. et Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 476 (7358), 101-105.
- Matunis, M.J., Wu, J. et Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *Journal of Cell Biology*, 140 (3), 499-509.
- Maymo, J.L., Perez Perez, A., Duenas, J.L., Calvo, J.C., Sanchez-Margalet, V. et Varone, C.L. (2010). Regulation of placental leptin expression by cyclic adenosine 5'-

- monophosphate involves cross talk between protein kinase A and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Endocrinology*, 151 (8), 3738-3751.
- Mayr, B. et Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (8), 599-609.
- Mazaud-Guittot, S., Prud'homme, B., Bouchard, M.F., Bergeron, F., Daems, C., Tevosian, S.G. et Viger, R.S. (2014). GATA4 Autoregulates Its Own Expression in Mouse Gonadal Cells via Its Distal 1b Promoter. *Biology of Reproduction*, 90 (2).
- Mazaud Guittot, S., Bouchard, M.F., Robert-Grenon, J.P., Robert, C., Goodyer, C.G., Silversides, D.W. et Viger, R.S. (2009). Conserved usage of alternative 5' untranslated exons of the GATA4 gene. *PLoS One*, 4 (12), e8454.
- Mazaud Guittot, S., Tetu, A., Legault, E., Pilon, N., Silversides, D.W. et Viger, R.S. (2007). The proximal Gata4 promoter directs reporter gene expression to sertoli cells during mouse gonadal development. *Biol Reprod*, 76 (1), 85-95.
- McClelland, K., Bowles, J. et Koopman, P. (2012). Male sex determination: Insights into molecular mechanisms. *Asian Journal of Andrology*, 14 (1), 164-171.
- McCoard, S.A., Wise, T.H., Fahrenkrug, S.C. et Ford, J.J. (2001). Temporal and spatial localization patterns of Gata4 during porcine gonadogenesis. *Biol Reprod*, 65 (2), 366-374.
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., De Kretser, D.M., Pratis, K. et Robertson, D.M. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 149-179.
- McLaren, A. (1984). Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 38, 7-23.
- McLaren, A. (2000). Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol*, 163 (1-2), 3-9.
- Melchior, F. (2000) SUMO - Nonclassical ubiquitin. : *Vol. 16* (pp. 591-626).
- Menghini, R., Marchetti, V., Cardellini, M., Hribal, M.L., Mauriello, A., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R. et Federici, M. (2005). Phosphorylation of GATA2 by akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: A novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation*, 111 (15), 1946-1953.

- Menke, D.B., Koubova, J. et Page, D.C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol*, 262 (2), 303-312.
- Menke, D.B. et Page, D.C. (2002). Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expression Patterns*, 2 (3-4), 359-367.
- Merchant, H. (1975). Rat gonadal and ovarioan organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol*, 44 (1), 1-21.
- Miller, W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine reviews*, 9 (3), 295-318.
- Miller, W.L. et Auchus, R.J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32 (1), 81-151.
- Mindnich, R., Möller, G. et Adamski, J. (2004). The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 218 (1-2), 7-20.
- Minegishi, N., Ohta, J., Suwabe, N., Nakauchi, H., Ishihara, H., Hayashi, N. et Yamamoto, M. (1998). Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J Biol Chem*, 273 (6), 3625-3634.
- Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I. et Aizawa, S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development*, 124 (9), 1653-1664.
- Miyamoto, S., Kawamura, T., Morimoto, T., Ono, K., Wada, H., Kawase, Y., Matsumori, A., Nishio, R., Kita, T. et Hasegawa, K. (2006). Histone acetyltransferase activity of p300 is required for the promotion of left ventricular remodeling after myocardial infarction in adult mice in vivo. *Circulation*, 113 (5), 679-690.
- Miyamoto, Y., Taniguchi, H., Hamel, F., Silversides, D.W. et Viger, R.S. (2008). A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol*, 9, 44.
- Molkentin, J.D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*, 275 (50), 38949-38952.
- Molkentin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A. et Olson, E.N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*, 11 (8), 1061-1072.

- Moniot, B., Berta, P., Scherer, G., Südbek, P. et Poulat, F. (2000). Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mechanisms of Development*, 91 (1-2), 323-325.
- Monk, M. et McLaren, A. (1981). X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, Vol. 63, 75-84.
- Morrisey, E.E., Ip, H.S., Lu, M.M. et Parmacek, M.S. (1996). GATA-6: A zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Developmental Biology*, 177 (1), 309-322.
- Morrisey, E.E., Ip, H.S., Tang, Z. et Parmacek, M.S. (1997). GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (13), 8515-8524.
- Morrisey, E.E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M.M., Jiang, F., Ip, H.S. et Parmacek, M.S. (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes and Development*, 12 (22), 3579-3590.
- Morrish, B.C. et Sinclair, A.H. (2002). Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction*, 124 (4), 447-457.
- Motta, P.M. et Makabe, S. (1982). Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus. A correlated study by scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res*, 226 (3), 493-510.
- Müller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G. et Jentsch, S. (2001). Sumo, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (3), 202-210.
- Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A. et Zabel, B. (1993). Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development*, 119 (4), 1329-1341.
- Munsterberg, A. et Lovell-Badge, R. (1991). Expression of the mouse anti-Mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*, 113 (2), 613-624.
- Muscatelli, F., Strom, T.M., Walker, A.P., Zanaria, E., Récan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl, W., Schwarz, H.P., Kaplan, J.C., Camerino, G., Meitinger, T. et Monaco, A.P. (1994). Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature*, 372 (6507), 672-676.
- Nachtigal, M.W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D.L., Flanagan, J.N., Hammer, G.D. et Ingraham, H.A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*, 93 (3), 445-454.

- Nagy, A., Gertsenstein, M., Behringer, R., eds (2003). *Manipulating the Mouse Embryo*. THIRD ed New York: *COLD SPRING HARBOR LABORATORY*. PRESS. 764 p.
- Nam, J.S., Turcotte, T.J., Smith, P.F., Choi, S. et Jeong, K.Y. (2006). Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the frizzled 8 and LRP6 receptors and activate β -catenin-dependent gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (19), 13247-13257.
- Narita, N., Bielinska, M. et Wilson, D.B. (1997). Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse. *Developmental Biology*, 189 (2), 270-274.
- Natoli, T.A., Alberta, J.A., Bortvin, A., Taglienti, M.E., Menke, D.B., Loring, J., Jaenisch, R., Page, D.C., Housman, D.E. et Kreidberg, J.A. (2004). Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis. *Developmental Biology*, 268 (2), 429-440.
- Nef, S. et Parada, L.F. (1999). Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Genet*, 22 (3), 295-299.
- Nel-Themaat, L., Jang, C.W., Stewart, M.D., Akiyama, H., Viger, R.S. et Behringer, R.R. (2011). Sertoli cell behaviors in developing testis cords and postnatal seminiferous tubules of the mouse. *Biol Reprod*, 84 (2), 342-350.
- Niakan, K.K., Davis, E.C., Clipsham, R.C., Jiang, M., Dehart, D.B., Sulik, K.K. et McCabe, E.R.B. (2006). Novel role for the orphan nuclear receptor *Dax1* in embryogenesis, different from steroidogenesis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88 (3), 261-271.
- Nishida, H., Miyagawa, S., Vieux-Rochas, M., Morini, M., Ogino, Y., Suzuki, K., Nakagata, N., Choi, H.S., Levi, G. et Yamada, G. (2008). Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression through the interaction between *Dlx* and GATA-4 for testicular steroidogenesis. *Endocrinology*, 149 (5), 2090-2097.
- O'Shaughnessy, P.J., Abel, M., Charlton, H.M., Hu, B., Johnston, H. et Baker, P.J. (2007). Altered expression of genes involved in regulation of vitamin A metabolism, solute transportation, and cytoskeletal function in the androgen-insensitive *Tfm* mouse testis. *Endocrinology*, 148 (6), 2914-2924.
- O'Shaughnessy, P.J., Baker, P., Sohnius, U., Haavisto, A.M., Charlton, H.M. et Huhtaniemi, I. (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*, 139 (3), 1141-1146.

- O'Shaughnessy, P.J., Johnston, H., Willerton, L. et Baker, P.J. (2002). Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *Journal of Cell Science*, 115 (17), 3491-3496.
- Ohara, Y., Atarashi, T., Ishibashi, T., Ohashi-Kobayashi, A. et Maeda, M. (2006). GATA-4 gene organization and analysis of its promoter. *Biol Pharm Bull*, 29 (3), 410-419.
- Onodera, K., Yomogida, K., Suwabe, N., Takahashi, S., Muraosa, Y., Hayashi, N., Ito, E., Gu, L., Rassoulzadegan, M., Engel, J.D. et Yamamoto, M. (1997). Conserved structure, regulatory elements, and transcriptional regulation from the GATA-1 gene testis promoter. *J Biochem*, 121 (2), 251-263.
- Orisaka, M., Tajima, K., Mizutani, T., Miyamoto, K., Tsang, B.K., Fukuda, S., Yoshida, Y. et Kotsuji, F. (2006). Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. *Biol Reprod*, 75 (5), 734-740.
- Orkin, S.H. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*, 80 (3), 575-581.
- Orkin, S.H. (1998). Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *International Journal of Developmental Biology*, 42 (7), 927-934.
- Ottolenghi, C., Colombino, M., Crisponi, L., Cao, A., Forabosco, A., Schlessinger, D. et Uda, M. (2007). Transcriptional control of ovarian development in somatic cells. *Seminars in Reproductive Medicine*, 25 (4), 252-263.
- Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz, J.E., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., Pilia, G. et Schlessinger, D. (2005). Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Human Molecular Genetics*, 14 (14), 2053-2062.
- Ouwerkerk, P.B. et Meijer, A.H. (2001). Yeast one-hybrid screening for DNA-protein interactions. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 12, Unit 12 12.
- Pailhoux, E., Parma, P., Sundström, J., Vigier, B., Serval, N., Kuopio, T., Locatelli, A., Pelliniemi, L.J. et Cotinot, C. (2001). Time course of female-to-male sex reversal in 38,XX fetal and postnatal pigs. *Developmental Dynamics*, 222 (3), 328-340.
- Pandolfi, P.P., Roth, M.E., Karis, A., Leonard, M.W., Dzierzak, E., Grosveld, F.G., Engel, J.D. et Lindenbaum, M.H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics*, 11 (1), 40-44.
- Paranko, J. (1987). Expression of type I and II collagen during morphogenesis of fetal rat testis and ovary. *Anatomical Record*, 219 (1), 91-101.

- Parker, K.L. (1999). Steroidogenic factor 1: a key mediator of endocrine development and function. *Medicina*, 59 (5 Pt 2), 540-541.
- Parker, K.L., Rice, D.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Wong, M., Bakke, M., Zhao, L., Frigeri, C., Hanley, N.A., Stallings, N. et Schimmer, B.P. (2002). Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res*, 57, 19-36.
- Parker, K.L. et Schimmer, B.P. (1995). Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitamins and Hormones*, 51, 339-370.
- Parker, K.L. et Schimmer, B.P. (1997). Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, 18 (3), 361-377.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A. et Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature Genetics*, 38 (11), 1304-1309.
- Payne, A.H. et Youngblood, G.L. (1995). REGULATION OF EXPRESSION OF STEROIDOGENIC ENZYMES IN LEYDIG-CELLS. *Biology of Reproduction*, 52 (2), 217-225.
- Pellegrini, L., Burke, D.F., Von Delft, F., Mulloy, B. et Blundell, T.L. (2000). Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature*, 407 (6807), 1029-1034.
- Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A.J., Rogers, A., Haber, D.A. et Housman, D. (1991). Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes and Development*, 5 (8), 1345-1356.
- Pelliniemi, L.J. (1975). Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *American Journal of Anatomy*, 144 (1), 89-112.
- Pepling, M.E. et Spradling, A.C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, 125 (17), 3323-3328.
- Perdomo, J., Jiang, X.M., Carter, D.R., Khachigian, L.M. et Chong, B.H. (2012). SUMOylation regulates the transcriptional repression activity of FOG-2 and its association with GATA-4. *PLoS One*, 7 (11), e50637.
- Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D.J. et Scholer, H. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev*, 71 (1-2), 89-98.

- Philibert, P., Zenaty, D., Lin, L., Soskin, S., Audran, F., Léger, J., Achermann, J.C. et Sultan, C. (2007). Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: A French collaborative study. *Human Reproduction*, 22 (12), 3255-3261.
- Philips, A.S., Kwok, J.C. et Chong, B.H. (2007). Analysis of the signals and mechanisms mediating nuclear trafficking of GATA-4: Loss of DNA binding is associated with localization in intranuclear speckles. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (34), 24915-24927.
- Pichler, A. et Melchior, F. (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic*, 3 (6), 381-387.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R. et Ruskoaho, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*, 63 (2), 196-207.
- Pilon, N., Oh, K., Sylvestre, J.R., Savory, J.G.A. et Lohnes, D. (2007). Wnt signaling is a key mediator of Cdx1 expression in vivo. *Development*, 134 (12), 2315-2323.
- Pilon, N., Raiwet, D., Viger, R.S. et Silversides, D.W. (2008). Novel pre- and post-gastrulation expression of Gata4 within cells of the inner cell mass and migratory neural crest cells. *Dev Dyn*, 237 (4), 1133-1143.
- Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Housman, D., Van Heyningen, V. et Hastie, N. (1990). The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*, 346 (6280), 194-197.
- Pu, W.T., Ishiwata, T., Juraszek, A.L., Ma, Q. et Izumo, S. (2004). GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis. *Dev Biol*, 275 (1), 235-244.
- Qin, Y. et Bishop, C.E. (2005). Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Human Molecular Genetics*, 14 (9), 1221-1229.
- Rajah, R., Glaser, E.M. et Hirshfield, A.N. (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn*, 194 (3), 177-192.
- Raymond, C.S., Kettlewell, J.R., Hirsch, B., Bardwell, V.J. et Zarkower, D. (1999). Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Developmental Biology*, 215 (2), 208-220.
- Raymond, C.S., Murphy, M.W., O'Sullivan, M.G., Bardwell, V.J. et Zarkower, D. (2000). Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes and Development*, 14 (20), 2587-2595.

- Raymond, C.S., Shamu, C.E., Shen, M.M., Seifert, K.J., Hirsch, B., Hodgkin, J. et Zarkower, D. (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 391 (6668), 691-695.
- Reincke, M., Beuschlein, F., Menig, G., Hofmockel, G., Arlt, W., Lehmann, R., Karl, M. et Allolio, B. (1998). Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex. *Journal of Endocrinology*, 156 (3), 415-423.
- Renstrom, E., Eliasson, L. et Rorsman, P. (1997). Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*, 502 (Pt 1), 105-118.
- Rhéaume, E., Lachance, Y., Zhao, H.F., Breton, N., Dumont, M., De Launoit, Y., Trudel, C., Luu-The, V., Simard, J. et Labrie, F. (1991). Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase in human adrenals and gonads. *Molecular Endocrinology*, 5 (8), 1147-1157.
- Richards, J.S. (2001). New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Molecular Endocrinology*, 15 (2), 209-218.
- Roche, A.E., Bassett, B.J., Samant, S.A., Hong, W., Blobel, G.A. et Svensson, E.C. (2008). The zinc finger and C-terminal domains of MTA proteins are required for FOG-2-mediated transcriptional repression via the NuRD complex. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44 (2), 352-360.
- Rojas, A., De Val, S., Heidt, A.B., Xu, S.M., Bristow, J. et Black, B.L. (2005). Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element. *Development*, 132 (15), 3405-3417.
- Rojas, A., Schachterle, W., Xu, S.M. et Black, B.L. (2009). An endoderm-specific transcriptional enhancer from the mouse Gata4 gene requires GATA and homeodomain protein-binding sites for function in vivo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 238 (10), 2588-2598.
- Rojas, A., Schachterle, W., Xu, S.M., Martin, F. et Black, B.L. (2010). Direct transcriptional regulation of Gata4 during early endoderm specification is controlled by FoxA2 binding to an intronic enhancer. *Dev Biol*, 346 (2), 346-355.
- Sander, V.A., Hapon, M.B., Sícario, L., Lombardi, E.P., Jahn, G.A. et Motta, A.B. (2011). Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 124 (1-2), 58-64.

- Sasano, H., Okamoto, M., Mason, J.I., Simpson, E.R., Mendelson, C.R., Sasano, N. et Silverberg, S.G. (1989). Immunolocalization of aromatase, 17 α -hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85 (1), 163-169.
- Sawyer, H.R., Smith, P., Heath, D.A., Juengel, J.L., Wakefield, S.J. et McNatty, K.P. (2002). Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod*, 66 (4), 1134-1150.
- Schimmer, B.P. et White, P.C. (2010). Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol*, 24 (7), 1322-1337.
- Schmahl, J., Eicher, E.M., Washburn, L.L. et Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*, 127 (1), 65-73.
- Schmahl, J., Kim, Y., Colvin, J.S., Ornitz, D.M. et Capel, B. (2004). Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development*, 131 (15), 3627-3636.
- Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.C. et Treier, M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131 (4), 933-942.
- Schrade, A., Kyronlahti, A., Akinrinade, O., Pihlajoki, M., Hakkinen, M., Fischer, S., Alastalo, T.P., Velagapudi, V., Toppari, J., Wilson, D.B. et Heikinheimo, M. (2015). GATA4 is a key regulator of steroidogenesis and glycolysis in mouse Leydig cells. *Endocrinology*, 156 (5), 1860-1872.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. et Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Research*, 17 (15), 6419.
- Seeler, J.S. et Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of sumo. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 (9), 690-699.
- Sekido, R. et Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, 453 (7197), 930-934.
- Sekido, R. et Lovell-Badge, R. (2009). Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet*, 25 (1), 19-29.
- Sharp, A., Kusz, K., Jaruzelska, J., Tapper, W., Szarras-Czapnik, M., Wolski, J. et Jacobs, P. (2005). Variability of sexual phenotype in 46,XX(SRY+) patients: The influence of spreading X inactivation versus position effects. *Journal of Medical Genetics*, 42 (5), 420-427.

- Shen, W.H., Moore, C.C.D., Ikeda, Y., Parker, K.L. et Ingraham, H.A. (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Mullerian inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade. *Cell*, 77 (5), 651-661.
- Shi, Y., Schonemann, M.D. et Mellon, S.H. (2009). Regulation of P450c17 expression in the early embryo depends on GATA factors. *Endocrinology*, 150 (2), 946-956.
- Shupnik, M.A (1996). Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes. *Trends Endocrinol Metab*, 7(8):272-6.
- Siggers, P., Smith, L. et Greenfield, A. (2002). Sexually dimorphic expression of Gata-2 during mouse gonad development. *Mechanisms of Development*, 111(1-2), 159-162.
- Sim, E.U.H., Smith, A., Szilagi, E., Rae, F., Ioannou, P., Lindsay, M.H. et Little, M.H. (200). Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene*, 21 (19), 2948-2960.
- Simard, J., Ricketts, M.L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F.A. et Melner, M.H. (2005). Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase gene family. *Endocrine Reviews*, 26 (4), 525-582.
- Simoni, M., Weinbauer, G.F, Gromoll, J. et Nieschlag, E. (1999). Role of FSH in male gonadal function. *Ann Endocrinol*, 60 (2): 102-6.
- Sinclair, A. et Smith, C. (2009). Females Battle to Suppress Their Inner Male. *Cell*, 139 (6), 1051-1053.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. et Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346 (6281), 240-244.
- Skinner, M.K., Tung, P.S. et Fritz, I.B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol*, 100 (6), 1941-1947.
- Staples, K.J., Bergmann, M., Tomita, K., Houslay, M.D., McPhee, I., Barnes, P.J., Giembycz, M.A. et Newton, R. (2001). Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-dependent inhibition of IL-5 from human T lymphocytes is not mediated by the cAMP-dependent protein kinase A. *J Immunol*, 167 (4), 2074-2080.
- Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., Pandolfi, P.P., Thompson, L.M. et Marsh, J.L. (2004). SUMO Modification of Huntingtin and Huntington's Disease Pathology. *Science*, 304 (5667), 100-104.

- Stolt, C.C., Lommes, P., Sock, E., Chaboissier, M.C., Schedl, A. et Wegner, M. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes and Development*, 17 (13), 1677-1689.
- Stork, P.J. et Schmitt, J.M. (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*, 12 (6), 258-266.
- Strauss, J.F. (2003). Epidemiology and genetics of polycystic ovary syndrome: recent date. *Epidémiologie et génétique du syndrome des ovaires polykystiques: les données récentes.*, 32 (3 Pt 2), S11-16.
- Südbeck, P. et Scherer, G. (1997). Two independent nuclear localization signals are present in the DNA- binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (44), 27848-27852.
- Sugawara, T., Holt, J.A., Kiriakidou, M. et Strauss Jii, J.F. (1996). Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry*, 35 (28), 9052-9059.
- Suzuki, Y.J. (2011). Cell signaling pathways for the regulation of GATA4 transcription factor: Implications for cell growth and apoptosis. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Cell Signal*, 23 (7), 1094-1099.
- Svechnikov, K. et Söder, O. (2008). Ontogeny of gonadal sex steroids. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, 22 (1), 95-106.
- Svensson, E.C., Huggins, G.S., Lin, H., Clendenin, C., Jiang, F., Tufts, R., Dardik, F.B. et Leiden, J.M. (2000). A syndrome of tricuspid atresia in mice with a targeted mutation of the gene encoding Fog-2. *Nature Genetics*, 25 (3), 353-356.
- Svensson, E.C., Tufts, R.L., Polk, C.E. et Leiden, J.M. (1999). Molecular cloning of FOG-2: A modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (3), 956-961.
- Svingen, T. et Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: Origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes and Development*, 27 (22), 2409-2426.
- Swain, A. et Lovell-Badge, R. (1999). Mammalian sex determination: A molecular drama. *Genes and Development*, 13 (7), 755-767.
- Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R. et Camerino, G. (1996). Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nature Genetics*, 12 (4), 404-409.

- Takaya, T., Kawamura, T., Morimoto, T., Ono, K., Kita, T., Shimatsu, A. et Hasegawa, K. (2008). Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (15), 9828-9835.
- Tallquist, M.D. et Soriano, P. (2000). Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genesis*, 26 (2), 113-115.
- Tam, P.P. et Snow, M.H. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 64, 133-147.
- Tanaka, T., Gondo, S., Okabe, T., Ohe, K., Shirohzu, H., Morinaga, H., Nomura, M., Tani, K., Takayanagi, R., Nawata, H. et Yanase, T. (2007). Steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells. *J Mol Endocrinol*, 39 (5), 343-350.
- Tevosian, S.G., Albrecht, K.H., Crispino, J.D., Fujiwara, Y., Eicher, E.M. et Orkin, S.H. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*, 129 (19), 4627-4634.
- Tevosian, S.G., Deconinck, A.E., Cantor, A.B., Rieff, H.I., Fujiwara, Y., Corfas, G. et Orkin, S.H. (1999). FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins friend of GATA-1 and U-shaped. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (3), 950-955.
- Tevosian, S.G., Deconinck, A.E., Tanaka, M., Schinke, M., Litovsky, S.H., Izumo, S., Fujiwara, Y. et Orkin, S.H. (2000). FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell*, 101 (7), 729-739.
- Thurisch, B., Liang, S.Y., Sarioglu, N., Schomburg, L., Bungert, J. et Dame, C. (2009). Transgenic mice expressing small interfering RNA against Gata4 point to a crucial role of Gata4 in the heart and gonads. *J Mol Endocrinol*, 43 (4), 157-169.
- Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., Yoshitome, A., Yamawaki, K., Amagai, M., Inoue, A., Oshima, T. et Kakitani, M. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Human Molecular Genetics*, 17 (9), 1278-1291.
- Tremblay, J.J., Hamel, F. et Viger, R.S. (2002). Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity. *Endocrinology*, 143 (10), 3935-3945.

- Tremblay, J.J., Robert, N.M. et Viger, R.S. (2001). Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. *Mol Endocrinol*, 15 (9), 1636-1650.
- Tremblay, J.J. et Viger, R.S. (1999). Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Molecular Endocrinology*, 13 (8), 1388-1401.
- Tremblay, J.J. et Viger, R.S. (2001). GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology*, 142 (3), 977-986.
- Tremblay, J.J. et Viger, R.S. (2003a). Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85 (2-5), 291-298.
- Tremblay, J.J. et Viger, R.S. (2003b). Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells. *J Biol Chem*, 278 (24), 22128-22135.
- Trussell, J. C (2013). Male reproductive endocrinology: when to replace gonadotropins. *Semin Reprod Med*, 31 (4): 237-44.
- Tsai, S.F., Strauss, E. et Orkin, S.H. (1991). Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*, 5 (6), 919-931.
- Tsal, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W. et Orkin, S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, 371 (6494), 221-226.
- Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M. et Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, 90 (1), 109-119.
- Tung, P.S. et Fritz, I.B. (1986). Extracellular matrix components and testicular peritubular cells influence the rate and pattern of Sertoli cell migration in vitro. *Dev Biol*, 113 (1), 119-134.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., Riethmacher, D., Schütz, G., Cooney, A.J., Lovell-Badge, R. et Treier, M. (2009). Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell*, 139 (6), 1130-1142.
- Ungewitter, E.K. et Yao, H.H. (2013). How to make a gonad: cellular mechanisms governing formation of the testes and ovaries. *Sex Dev*, 7 (1-3), 7-20.

- Ungewitter, E.K. et Yao, H.H.C. (2012). How to make a gonad: Cellular mechanisms governing formation of the testes and ovaries. *Sexual Development*, 7 (1-3), 7-20.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N. et McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397 (6718), 405-409.
- van Berlo, J.H., Elrod, J.W., Aronow, B.J., Pu, W.T. et Molkenin, J.D. (2011). Serine 105 phosphorylation of transcription factor GATA4 is necessary for stress-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (30), 12331-12336.
- Varshavsky, A. (2005). Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci*, 30 (6), 283-286.
- Vergouwen, R.P., Jacobs, S.G., Huiskamp, R., Davids, J.A. et de Rooij, D.G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil*, 93 (1), 233-243.
- Vidal, V.P.I., Chaboissier, M.C., De Rooij, D.G. et Schedl, A. (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics*, 28 (3), 216-217.
- Viger, R.S., Guittot, S.M., Anttonen, M., Wilson, D.B. et Heikinheimo, M. (2008). Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Mol Endocrinol*, 22 (4), 781-798.
- Viger, R.S., Mertineit, C., Trasler, J.M. et Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development*, 125 (14), 2665-2675.
- Viger, R.S., Taniguchi, H., Robert, N.M. et Tremblay, J.J. (2004). The 25th volume: Role of the GATA family of transcription factors in andrology. *Journal of Andrology*, 25 (4), 441-452.
- Walker, W.H. et Cheng, J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 130 (1), 15-28.
- Wang, J., Feng, X.H. et Schwartz, R.J. (2004). SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (47), 49091-49098.
- Wang, L. et Wessler, S.R. (2001). Role of mRNA secondary structure in translational repression of the maize transcriptional activator Lc. *Plant Physiology*, 125 (3), 1380-1387.

- Warr, N., Carre, G.A., Siggers, P., Faleato, J.V., Brixey, R., Pope, M., Bogani, D., Childers, M., Wells, S., Scudamore, C.L., Tedesco, M., del Barco Barrantes, I., Nebreda, A.R., Trainor, P.A. et Greenfield, A. (2012). Gadd45gamma and Map3k4 interactions regulate mouse testis determination via p38 MAPK-mediated control of Sry expression. *Dev Cell*, 23 (5), 1020-1031.
- Wartenberg, H., Kinsky, I., Viebahn, C. et Schmolke, C. (1991). Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 19 (2), 133-157.
- Watt, A.J., Battle, M.A., Li, J. et Duncan, S.A. (2004). GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (34), 12573-12578.
- Wei, Q., Yokota, C., Semenov, M.V., Doble, B., Woodgett, J. et He, X. (2007). R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and β -catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (21), 15903-15911.
- Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. [Review]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (3), 169-178.
- Whyatt, D.J., DeBoer, E. et Grosveld, F. (1993). The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBO Journal*, 12 (13), 4993-5005.
- Wilhelm, D. et Englert, C. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl. *Genes and Development*, 16 (14), 1839-1851.
- Wilhelm, D., Palmer, S. et Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87 (1), 1-28.
- Wilhelm, D., Washburn, L.L., Truong, V., Fellous, M., Eicher, E.M. et Koopman, P. (2009). Antagonism of the testis- and ovary-determining pathways during ovotestis development in mice. *Mechanisms of Development*, 126 (5-6), 324-336.
- Wood, J.R., Nelson, V.L., Ho, C., Jansen, E., Wang, C.Y., Urbanek, M., McAllister, J.M., Mosselman, S. et Strauss Iii, J.F. (2003). The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (29), 26380-26390.
- Woodson, K.G., Crawford, P.A., Sadovsky, Y. et Milbrandt, J. (1997). Characterization of the promoter of SF-1, an orphan nuclear receptor required for adrenal and gonadal development. *Mol Endocrinol*, 11 (2), 117-126.

- Xin, M., Davis, C.A., Molkentin, J.D., Lien, C.L., Duncan, S.A., Richardson, J.A. et Olson, E.N. (2006). A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (30), 11189-11194.
- Xue, S., Tian, S., Fujii, K., Kladwang, W., Das, R. et Barna, M. (2014). RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature*, 517(7532): 33-8.
- Yamamoto, M., Ko, L.J., Leonard, M.W., Beug, H., Orkin, S.H. et Engel, J.D. (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes and Development*, 4 (10), 1650-1662.
- Yanazume, T., Hasegawa, K., Morimoto, T., Kawamura, T., Wada, H., Matsumori, A., Kawase, Y., Hirai, M. et Kita, T. (2003). Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Molecular and Cellular Biology*, 23 (10), 3593-3606.
- Yang, H.Y. et Evans, T. (1992). Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Molecular and Cellular Biology*, 12 (10), 4562-4570.
- Yao, H.H., Matzuk, M.M., Jorgez, C.J., Menke, D.B., Page, D.C., Swain, A. et Capel, B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn*, 230 (2), 210-215.
- Yao, H.H.C., Aardema, J. et Holthusen, K. (2006). Sexually dimorphic regulation of inhibin beta B in establishing gonadal vasculature in mice. *Biology of Reproduction*, 74 (5), 978-983.
- Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J.D. et Yamamoto, M. (1994). Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development*, 120 (7), 1759-1766.
- Yoshinaga, K., Hess, D.L., Hendrickx, A.G. et Zamboni, L. (1988). The development of the sexually indifferent gonad in the prosimian, *Galago crassicaudatus crassicaudatus*. *American Journal of Anatomy*, 181 (1), 89-105.
- Young, J.M. et McNeilly, A.S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, 140 (4), 489-504.
- Yu, R.N., Achermann, J.C., Ito, M. et Jameson, J.L. (1998). The role of DAX-1 in reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 9 (5), 169-175.
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R.B., Meitinger, T., Monaco, A.P., Sassone-Corsi, P. et Camerino, G. (1994). An unusual member of the nuclear hormone

receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*, 372 (6507), 635-641.

- Zarkower, D. (2001). Establishing sexual dimorphism: Conservation amidst diversity? *Nature Reviews Genetics*, 2 (3), 175-185.
- Zhang, F.P., Poutanen, M., Wilbertz, J. et Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology*, 15 (1), 172-183.
- Zhao, Y., Kwon, S.W., Anselmo, A., Kaur, K. et White, M.A. (2004). Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (20), 20999-21002.
- Zheng, M., Zhu, J., Lu, T., Liu, L., Sun, H., Liu, Z. et Tian, J. (2013). P300-mediated histone acetylation is essential for the regulation of gata4 and MEF2C by BMP2 in H9c2 cells. *Cardiovascular Toxicology*, 13 (4), 316-322.
- Zhou, P., He, A. et Pu, W.T. (2012) Regulation of GATA4 Transcriptional Activity in Cardiovascular Development and Disease. : *Vol. 100. Current Topics in Developmental Biology* (pp. 143-169).
- Zhou, X., Kudo, A., Kawakami, H. et Hirano, H. (1996). Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anatomical Record*, 245 (3), 509-518.
- Zhou, Y., Lim, K.C., Onodera, K., Takahashi, S., Ohta, J., Minegishi, N., Tsai, F.Y., Orkin, S.H., Yamamoto, M. et Engel, J.D. (1998). Rescue of the embryonic lethal hematopoietic defect reveals a critical role for GATA-2 in urogenital development. *EMBO Journal*, 17 (22), 6689-6700.
- Zimmermann, S., Steding, G., Emmen, J.M., Brinkmann, A.O., Nayernia, K., Holstein, A.F., Engel, W. et Adham, I.M. (1999). Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol*, 13 (5), 681-691.
- Zirkin, B.R., Santulli, R., Awoniyi, C.A. et Ewing, L.L. (1989). Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology*, 124 (6), 3043-3049.