

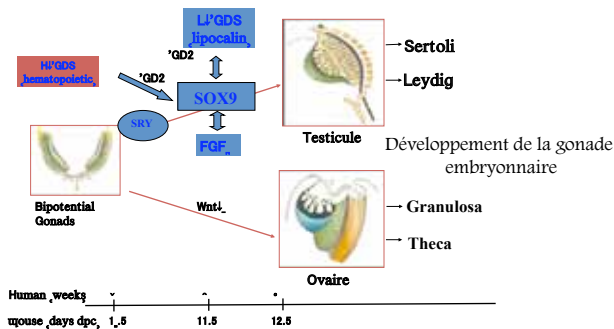
# TESTISDEV

Biologie & santé 2007- Brigitte Boizet-Bonhoure, coordinateur  
Marie-Christine Chaboissier, partenaire  
Deciphering the genetic program controlled by the male sex determining factor SOX9



## Contexte- Objectifs- Méthodes

Le facteur de transcription SOX9 est nécessaire et suffisant pour la différenciation de la cellule de Sertoli, cellule organisatrice du testicule embryonnaire. Peu d'informations étaient disponibles sur les gènes qu'il active et qui joueraient un rôle dans la détermination testiculaire. Seul l'*Amh* était identifiée comme gène cible de SOX9.



Objectif du projet:

- identifier l'ensemble de gènes composant le programme génétique de différenciation des cellules de Sertoli.
- comprendre les événements précoces induits par SOX9, vers la compréhension de syndromes génétiques d'inversion de sexe et d'infertilité dans l'espèce humaine.

Méthodes:

1- Immunoprécipitation de chromatine (ChIP) couplée à du séquençage haut débit (ChIP-seq). Trois stades de la vie testiculaire ont été choisis : 13.5 jpc stade embryonnaire de morphogenèse testiculaire, 8 jpp (jours post-partum) stade post-natal où les cellules souches de la spermatogenèse reprennent leur prolifération, et 6 semaines, stade adulte d'intense activité spermatogénique (Partenaire 1).

2- Analyse transcriptomique de gonades embryonnaires à 13.5 jpc en absence (souris KO) ou en présence (transgénèse additionnelle) de SOX9 (Partenaire 2).

## Résultats

1- La prostaglandine D2 (PGD2) produite par les deux PG synthases, L-Pgds et H-Pgds contrôle la translocation nucléaire de SOX9 (2, 5). Grâce à des modèles de souris invalidés pour les gènes *Sox9* ou *L-Pgds*, nous avons identifié une boucle de régulation entre ces deux gènes, concomitante à la boucle *Sox9/Fgf9*, et nécessaire à l'amplification du signal SOX9, identifiant le gène *L-Pgds* comme gène cible de SOX9 (2).

L'immunoprécipitation de la chromatine de gonades aux 3 stades cités a été mise au point: 1500 gonades à 13.5 jpc ont été nécessaires et une expérience de ChIP nécessite environ 200 testicules embryonnaires. L'analyse informatique des données de CHIP-seq (logiciel MACS) a porté sur les tags, petites séquences de 36 bp obtenus lors du séquençage. Les régions de fixation de SOX9 ont été cartographiées (distance de 50 Kb comme valeur seuil de proximité d'un gène) et la présence du motif de fixation de SOX9 a été recherchée dans la séquence de chaque pic. Les

résultats ont été comparés au transcriptome issu de ce projet (XY/XY *Sox9* KO) et aux transcriptomes publiés des cellules de Sertoli embryonnaires à 13.5 jpc, du testicule à 8 jpp ou d'ovaire à 7 jpp. Nous avons établi une large liste de gènes contrôlés par la protéine SOX9 (régulation du cycle cellulaire, matrice extracellulaire, signalisation) dont certains étaient déjà connus comme *cerebelline* (*Cbln4*). De plus, des gènes codant pour des microARNs (miR) seraient sous le contrôle de SOX9 dans la différenciation testiculaire. Un grand nombre de pics à 13.5 jpc sont à proximité de gènes non décrits dans les transcriptomes de gonades embryonnaires et ne sont donc pas régulés différenciellement entre mâle et femelle. Ces gènes cibles potentiels de SOX9 sont en cours de validation par RT-qPCR et hybridation *in situ*.

**2-Etude perte de fonction de *Sox9***: à partir de la lignée transgénique *Sf1:cre<sup>tg</sup>/+* (ablation de gènes flanqués de séquences *lox* dans l'axe gonadal-pituitaire), génération des mutations de *Sox9* (*Sox9* KO) spécifiquement dans la gonade. Les animaux adultes XY *Sox9* KO sont des femelles qui sont hypofertiles (4). Un crible d'expression différentielle (Affymetrix) réalisé avec des gonades XX, XY et XY *Sox9* KO à 13.5 jpc, a identifié 379 gènes différenciellement exprimés dans les gonades XY versus XY *Sox9* KO. Les gonades embryonnaires ont un profil transcriptionnel intermédiaire entre gonades mâles et femelles résultant d'une expression résiduelle des gènes masculinisants (*Sox8*, *Sox10*, *L-Pgds*, *Fgf9*) tandis que les gènes féminisants (*FoxL2*, *Wnt4*, *Rspo1*, *Bmp2*, *Fst*) ne sont pas complètement activés dans les gonades XY *Sox9* KO (4). Des études de gain de fonction de *Sox9* (expression ectopique de *Sox9* (*Wt1:Sox9<sup>Tg</sup>*)) dans les gonades XX, résultent en une inversion de sexe des individus XX adultes, précédée par un développement d'un ovotesticule embryonnaire composé d'une région centrale testiculaire et de pôles ovariens (3). L'hétérogénéité de ce tissu embryonnaire a été un obstacle à l'analyse transcriptomique différentielle XX/ XX *Wt1:Sox9<sup>Tg</sup>*.

## Conclusions et Perspectives

Mise au point de la technique de ChIP-seq sur des gonades embryonnaires, caractérisation des gonades des modèles souris *Sox9* KO et transgéniques *Sox9* et identification de nombreux gènes potentiellement impliqués dans le développement testiculaire en plus de ceux déjà décrits: vers de nouveaux concepts quant à la fonction de la protéine SOX9 et son rôle dans la différenciation testiculaire et au-delà, vers de nouvelles approches sur la régulation de l'expression du génome par cette protéine.

## Publications

- 1- Bradford S.T., Hiramatsu R., Maddugoda M.P., Bernard P., Chaboissier M.C., Sinclair A., Schedl A., Harley V., Kanai Y., Koopman P. and Wilhelm D. (2009). *Biol. of Reprod.* 80, 1178-1188.
- 2- Moniot B<sup>\*</sup>, Declosmenil F<sup>\*</sup>, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, Cohen-Solal A, Klattig J, Englert C, Kim Y, Capel B, Eguchi N, Urade Y, Boizet-Bonhoure B<sup>\*</sup> and Poulat F<sup>\*</sup>. (2009). *Development*, 136, 1813-1821. (\* et ? : co-auteurs).
- 3- Gregoire EP, Lavery R, Chassot AA, Akiyama H, Treier M, Behringer RR, Chaboissier MC. (2011). *Dev Biol.* 349, 65-77.
- 4- Lavery R., Lardenois A., Ranc-Jianmotamedi F<sup>\*</sup>, Pauper E<sup>\*</sup>, Gregoire E.P., Vigier C., Moreillon C., Primig M. and Chaboissier M.C. (2011). *Dev. Biol.* in press. (\* : co-auteurs).
- 5- B. Moniot, A. Farhat, K. Aritake, F. Declosmenil, S. Nef, N. Eguchi, Y. Urade, F. Poulat and B. Boizet-Bonhoure (2011). *Dev. Dyn.* En révision.

### CONTACT :

Brigitte Boizet-Bonhoure/ Francis Poulat Institut de Génétique Humaine CNRS UPR1142,  
Montpellier Cedex 5 Tél 04 34 35 99 40  
Boizet@igh.cnrs.fr, Francis@igh.cnrs.fr  
Marie-Christine Chaboissier INSERM U686, Université de Nice Parc Valrose, Nice  
Tél 04 92 07 64 51 Marie-Christine.CHABOISSIER@unice.fr

