

FRÉDÉRIC HAMEL

**RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GÈNE
SRY HUMAIN ET PORCIN PAR LE FACTEUR DE
TRANSCRIPTION GATA-4.**

Mémoire présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

OCTOBRE, 2004

Résumé

Chez les mammifères euthériens, la détermination du sexe est étroitement contrôlée par l'expression d'un gène clé, appelé *SRY*, présent sur le chromosome Y. Une étude d'inactivation génique chez la souris a démontré que la protéine Gata-4, un membre de la famille de facteurs de transcription GATA, est essentielle pour la différenciation testiculaire ainsi qu'à l'expression de *Sry*. Ceci suggère que GATA-4 régule le développement testiculaire via l'activation de *SRY*. En accord avec cette hypothèse, les promoteurs *SRY* de porc, de souris et d'humain arborent tous plusieurs sites de liaison pour les facteurs GATA. Le but de mon étude est de vérifier le rôle de GATA-4 dans la régulation transcriptionnelle de *SRY* du porc et de l'humain par transfections transitoires de différentes constructions promotrices *SRY* délétées ou mutées dans les sites GATA. Mes résultats démontrent que GATA-4 active le promoteur *SRY* porcin mais pas celui de l'humain. Donc, malgré la conservation de fonction de *SRY* entre les espèces, sa régulation génique diffère.

Remerciements

Je tiens d'abord à souligner l'appuie de mon directeur de recherche Robert S. Viger qui a cru en moi depuis le tout début de mon cheminement. Je le remercie de m'avoir offert ces nombreuses opportunités uniques de me faire connaître le monde de la recherche.

Cette étude n'aurait jamais pu être rendu possible sans le soutien continu de personnes ressources. J'entends tout particulièrement les conseils avisés de Jacques J. Tremblay qui ont démystifiés nombreux de mes questionnements. Je ne peux passer sous silence le dévouement de Nicholas Robert qui m'a enseigné les multiples techniques de laboratoire. Il m'en coûterait aussi de ne pas mentionner le support de Suzanne Thomas qui m'a permis de faire progresser mes recherches plus rapidement.

Merci à mes collègues de travail, Nick, Marie-France, Yoko, Hiroaki, Suzanne et Jacques dont l'humour et la gentillesse ont rendus mes études de maîtrise encore plus agréables.

Finalement, merci à ma mère pour son assiduité dans la lecture et la relecture de mon mémoire.

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Chapitre I : Introduction	1
1.0 Introduction.....	1
1.1 La détermination du sexe chez les animaux	1
1.2 Le sexe chromosomique	3
1.2.1 La découverte de <i>SRY</i>	3
1.3 Le sexe gonadique	4
1.3.1 Gonadogenèse.....	4
1.3.2 La détermination du sexe par <i>SRY</i>	5
1.3.2.1 SOX9	9
1.4 <i>SRY</i> : Structure protéique et Régulation génique.....	10
1.4.1 La protéine <i>SRY</i>	10
1.4.2 Les mutations de <i>SRY</i>	12
1.4.3 La régulation transcriptionnelle de <i>SRY</i>	13
1.4.3.1 Régulation de <i>SRY</i> par SF1 et Sp1	15
1.4.3.2 Le dilemme de DAX1	16
1.4.3.3 Régulation de <i>SRY</i> par WT1	17
1.4.3.4 Régulation de <i>SRY</i> par GATA-4 et FOG2.....	21
1.5 Hypothèse de travail	25
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	26
2.1 Clonage des différents délétants des promoteurs <i>SRY</i> porcin et humain.....	26
2.1.1 Amplification de fragments des promoteurs par PCR.....	26
2.1.2 Séparation des fragments et des plasmides par migration sur gel d'agarose.....	28
2.1.3 Isolation de l'ADN à partir du gel d'agarose.....	28
2.1.4 Digestion du fragment et du plasmide rapporteur hôte.....	29
2.1.5 Ligation des fragments avec le plasmide rapporteur hôte.....	29
2.1.6 Transformation de bactéries compétentes avec les ligations.....	29
2.1.7 Isolation de l'ADN plasmidique produit par les bactéries.....	30
2.1.8 Confirmation de la présence du fragment dans le plasmide rapporteur.....	30
2.1.8.1 Digestion.....	30
2.1.8.2 Séquençage par extension d'amorce.....	31
2.1.9 Amplification du plasmide dans bactéries XL-1 bleu.....	31
2.1.10 Confirmation de la présence du fragment dans le plasmide.....	33
2.2 Culture des différentes lignées cellulaires CV-1, PGR, TM4.....	33
2.3 Transfections des constructions plasmidiques dans les cellules.....	33
2.4 Mutagenèse dirigée des sites GATA sur le promoteur porcin.....	35
2.4.1 Polymérisation en chaînes.....	35
2.4.2 Digestion des plasmides parentaux.....	37
2.4.3 Transformation.....	38

2.5 Retardement sur gel	39
2.5.1 Production de protéines GATA-4 à partir de la trousse TnT.....	39
2.5.2 Préparation de sondes radioactives et sondes froides	39
2.5.3 Liaison entre la protéine GATA-4 et les éléments GATA.	42
Chapitre III : Résultats	43
3.1 Caractérisation des promoteurs <i>SRY</i> humain, porcin et de souris.....	43
3.2 Clonage de délétions de la région 5' régulatrice du gène <i>SRY</i> humain et porcin.	44
3.3 Rôle de GATA-4 dans la régulation transcriptionnelle du promoteur <i>SRY</i> humain et porcin.	45
3.4 Régulation du promoteur <i>SRY</i> humain et porcin par les isoformes de WT1 et par GATA-4.	47
3.5 La liaison du facteur de transcription GATA-4 aux éléments GATA du promoteur <i>SRY</i> porcin est spécifique.....	50
3.6 L'importance des éléments GATA sur le promoteur <i>SRY</i> porcin.....	52
3.7 La liaison coopérative de GATA-4 au promoteur <i>SRY</i> porcin.	56
Chapitre IV: Conclusion	59
Chapitre V : Perspectives.....	66
Bibliographie	68

Liste des tableaux

Chapitre II

Tableau 2.1 Amorces 5' utilisées lors du clonage des différentes délétions des promoteurs <i>SRY</i> du porc et de l'humain contenant différents nombres de sites GATA consensus.	27
Tableau 2.2 Cycle PCR du clonage des différentes délétions des promoteurs <i>SRY</i> du porc et de l'humain.	28
Tableau 2.3 Oligos contenant les sites GATA a, b, c ou d du promoteur <i>SRY</i> de porc utilisés la mutagenèse de ces sites.	36
Tableau 2.4 Cycle PCR de la mutagenèse dirigée des différents site GATA se trouvant sur les différentes constructions du promoteur <i>SRY</i> du porc.	37
Tableau 2.5 Oligos contenant différents sites GATA du promoteur <i>SRY</i> de porc utilisés lors de retardement sur gel.	40
Tableau 2.6 Oligos contenant les sites GATA a-b-c-d du promoteur <i>SRY</i> de porc utilisés lors de retardement sur gel.	41

Liste des figures

Chapitre I

- Figure 1.1 Représentation du cheminement normal de la détermination du sexe à l'obtention du sexe phénotypique. 3
- Figure 1.2 Schéma de la protéine WT1. 18
- Figure 1.3 Voie de signalisation moléculaire du développement sexuel des mammifères. .25

Chapitre II

- Figure 2.1 Positions des différents sites GATA étudiés sur les promoteurs *SRY* du porc et de l'humain. 35

Chapitre III

- Figure 3.1 Distribution des éléments GATA consensus ainsi que des éléments de liaison potentielle WT1 sur les promoteurs *SRY* du porc, de l'humain et de la souris. 44
- Figure 3.2 Transactivation du promoteur *SRY* porcine par la protéine GATA-4 dans les cellules CV-1. 46
- Figure 3.3 Transactivation de constructions du promoteur *SRY* humain par la protéine GATA-4 dans les cellules CV-1. 47
- Figure 3.4 Transactivation de la délétion du promoteur *SRY* humain de longueur de 1242 pb et 1605 pb par les isoformes de WT1 et GATA-4 dans cellules CV-1. 48
- Figure 3.5 Transactivation dans les cellules TM4 du promoteur *SRY* porcine de longueur 1375 pb par les isoformes (+/- KTS) de WT1 et par GATA-4. 49
- Figure 3.6 Retardement sur gel d'une sonde contenant le site GATA proximal du promoteur *SRY* porcine en présence de la protéine recombinante GATA-4. 51
- Figure 3.7 Importance des éléments GATA dans l'activation du promoteur *SRY* porcine de longueur de 508 pb. 53
- Figure 3.8 Importance des éléments GATA dans l'activation du promoteur *SRY* porcine de longueur de 730 pb. 54
- Figure 3.9 Importance des éléments GATA dans l'activation du promoteur *SRY* porcine de longueur de 1377 pb. 55
- Figure 3.10 Retardement sur gel de sondes construites à partir des quatre éléments GATA proximaux retrouvés sur le promoteur *SRY* porcine en présence de 1 ou 2 μ l de protéine GATA-4. 58
- Figure 3.11 Valeurs de densité intégrée des bandes représentant la liaison entre 1 ou 2 μ l de protéine recombinante GATA-4 et les sondes radioactives comportants les quatre sites GATA proximaux. 59

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

APS : Ammonium persulfate

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATG : Codon initiateur codant pour une méthionine

°C : degré Celsius

CD : Dysplasie campomélique

DAX-1 : Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hyperplasia congenital, critical region on the X chromosome, gene 1

DDS : syndrome de Denys-Drash

dIdC : Acide Polydeoxyinosinique-Deoxycytidylique

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMRT1 : Double-sex and mab3 related transcription factor 1

DMSO : diméthyl sulfoxyde

DMY : DM-domain gene on the Y-chromosome

dpc : jour *post-coïtum*

E : jour embryonnaire

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

FOG2 : Friend of GATA 2

GFP : Green fluorescence protein

HMG : High-mobility group

H₂O : eau

Kb : Kilo paires de bases

SF1 : Steroidogenic factor 1

pb : paire de bases

min : minute

MIS : Müllerian inhibiting substance

MOPS : 3-(N-Morpholino) propane acide sulfonique

rpm : rotation par minute

SDS : Sodium dodecyl sulphate

SOX : Sry-related HMG-box

SRY : Sex-determining region Y-chromosome

T4-PNK : T4-polynucléotidekinase

TBE : Tris-Borate-EDTA

Temed : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

TDF : Testis determining factor

WAGR : Wilms' tumor, aniridia, genitourinary abnormalities, and mental retardation

WT1 : Wilms' tumor 1

WTE : Élément de liaison aux protéines WT1

Chapitre I : Introduction

1.0 Introduction

L'explication de l'attribution du sexe a beaucoup évolué depuis que l'on a commencé à se poser des questions sur l'origine des sexes. Qu'est ce qui influence le développement d'une fille plutôt qu'un garçon et vice-versa? Il a longtemps été pensé que la femme n'était qu'un récipient dans lequel l'homme insérait un enfant microscopique pour qu'il s'y développe. Au temps de l'Antiquité, les philosophes proposaient leur explication bien à eux. Hippocrate a proposé que le testicule droit donne naissance à des garçons et le gauche à des filles. Selon Aristote, le sexe de l'enfant est déterminé par la vigueur avec laquelle l'homme s'accouple avec sa femme. Plus l'homme met de cœur à l'ouvrage, plus ses chances d'obtenir un petit mâle augmentent. Heureusement, la venue de la science médicale, de la génétique et de la biologie moléculaire nous a fait faire un bond incroyable dans la compréhension de ce mystère.

1.1 La détermination du sexe chez les animaux

Aujourd'hui, bien que nous en connaissions davantage sur le sujet, la question est loin d'être complètement élucidée. Nous savons, entre autre, que les différents règnes animaux n'exercent pas tous la détermination du sexe par le même procédé. Par exemple, chez les reptiles, c'est la température de l'œuf lors de l'incubation qui déterminera le sexe des petits. La température influencerait l'expression de gènes déterminants dans le développement sexuel. La génétique de la détermination du sexe chez les poissons peut impliquer des systèmes monogéniques ou polygéniques, dont les facteurs peuvent se retrouver sur des chromosomes autosomaux ou sexuels. Récemment, *DMY* a été trouvé sur la région de la détermination du sexe sur le chromosome Y du poisson medeka. Les études d'analyses de fonction et d'expression place *DMY* au premier rang des candidats pour la détermination du sexe masculin chez les poissons (1). Certains poissons ont la particularité

de pouvoir changer de sexe en présence d'hormone dans leur milieu, même lorsqu'ils sont adultes. On retrouve aussi des systèmes liés aux chromosomes sexuels pour la détermination du sexe chez les oiseaux et les mammifères. Chez les oiseaux, les mâles sont ZZ et les femelles sont ZW. Toutefois, le débat continue à savoir si le sexe est attribué selon une dose dépendante d'un (ou de plusieurs) gène se trouvant sur le chromosome sexuel Z ou selon la présence d'un (ou de plusieurs) gène déterminant femelle se trouvant sur le chromosome sexuel W. Chez les mammifères, c'est la présence du chromosome Y qui enclenche la détermination du sexe masculin ou en son absence laisse une voie, dites par défaut, conduire au sexe féminin.

Avant d'aller plus loin, il importe de bien faire la distinction entre le sexe chromosomique, le sexe gonadique et le sexe phénotypique (voir **figure 1.1**). Lors du développement des mammifères, les gonades se développent de façon indifférenciée, jusqu'à un certain stade, peu importe le sexe chromosomique, c'est-à-dire peu importe s'il y a présence ou absence du chromosome Y. Par la suite, le chromosome Y induit la différenciation de la gonade en testicule ou en absence du chromosome Y, la gonade se différencie en ovaire. À ce moment, il s'agit de l'étape de la détermination du sexe qui conduit à l'obtention du sexe gonadique. Finalement, dépendamment du sexe gonadique obtenu, et de la conservation de sa fonction, l'organisme en entier sera différencié à l'aide d'hormones produites par les gonades. Suite à cette différenciation globale, l'organisme acquiert son sexe phénotypique.

Qu'est ce qui se trouve sur le chromosome Y des mammifères afin que la destinée sexuelle de l'organisme ne repose que sur sa présence?

La réponse : un seul gène situé sur le bout du chromosome Y est responsable du développement du sexe masculin. Ce gène s'appelle *SRY*, du nom anglais « Sex Determining region Y-chromosome » ou région de détermination du sexe sur le chromosome Y.

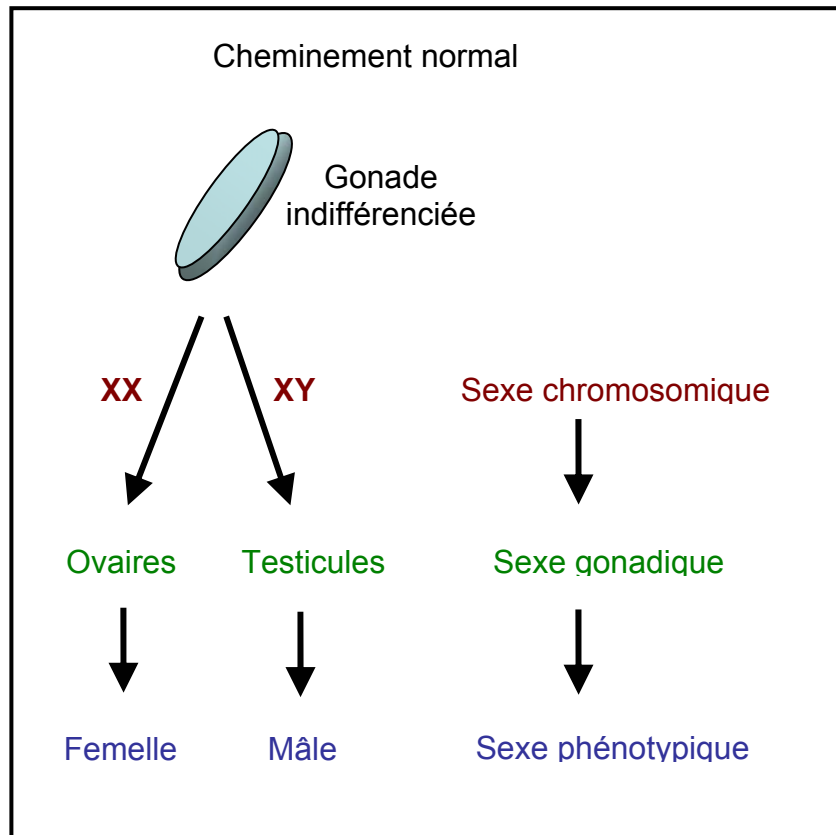


Figure 1.1 Représentation du cheminement normal de la détermination du sexe à l'obtention du sexe phénotypique.

1.2 Le sexe chromosomique

1.2.1 La découverte de *SRY*

L'existence d'un tel gène a été trouvée par l'observation de recombinaisons homologues entre les deux chromosomes sexuels de personnes caryotypées XY ayant subi une réversion sexuelle femelle. En effet, il a été découvert qu'une partie dans le haut du chromosome Y, de certaines femmes XY, avait été remplacée par une section du chromosome X paternel. Ainsi, l'idée de gène responsable de la détermination sexuelle masculine (TDF pour Testis-Determining Factor) a été mise de l'avant et ce facteur a été

localisé dans la partie supérieure du chromosome Y. La région où pouvait se trouver ce facteur déterminant s'est amincie suite à la comparaison de diverses recombinaisons homologues entre chromosomes sexuels. On a démontré que *SRY* était, en fait, le facteur de détermination sexuelle masculine par des études de gain de fonction dans des souris transgéniques où le transgène *Sry* produisait des souris XX mâles (2). Et le fait que ces souris XX transgéniques possèdent des testicules et des cordons testiculaires normaux indique que *Sry* est le seul gène, encodé sur le chromosome Y, qui s'avère nécessaire pour la formation des testicules et, conséquemment, pour l'obtention du phénotype mâle. (2;3).

Cela fait maintenant plus de dix ans que le gène *SRY* a été identifié (4). Cette découverte annonçait le début d'une conquête au mécanisme d'action de la détermination du sexe. Si l'on avait demandé, à l'époque, aux chercheurs qui s'intéressaient à ce sujet, où en serait la science de la détermination du sexe en 2004, ils auraient répondu que tout aurait été trouvé et que la détermination sexuelle serait un sujet clos. Or, malgré les nombreuses recherches qui s'effectuent au travers le monde, nous ne connaissons que quelques facteurs et nous n'avons pas fini d'élucider chacun de leurs rôles.

1.3 Le sexe gonadique

1.3.1 Gonadogenèse

Avant d'arriver au point critique de la détermination du sexe, les gonades embryonnaires XX et XY passent par un stade identique, celui de gonades indifférenciées. Le développement de cette gonade bipotentielle requiert l'expression d'un éventail de gènes codant pour des facteurs de transcription. Un gène très important pour le développement du système urogénital chez la souris est *Emx2*, un gène homologue de *ems* de la drosophile et codant pour une homéoprotéine. En absence de *Emx2*, la formation de la crête urogénitale est hautement compromise (5). Les souris qui n'expriment pas *Sfl*, un récepteur nucléaire orphelin, ne développent pas de gonades ni de surrénales (6). *Wt1* est un autre gène essentiel, car en absence de *Wt1*, au jour 11 post-coïtum, l'épithélium coelomique de la crête génitale ne s'épaissit pas et devient la composante gonadique principale (7). Il y a d'autres gènes essentiels à la formation de ces gonades, à savoir, *Lim1*,

Lhx9 et *Gata-4*. Les mutations qui abolissent l'expression de l'un de ces gènes abolissent, ou dérèglent, par le fait même la formation gonadique chez les deux sexes(8). Par exemple, chez les souris où le gène *Lhx9* a été inactivé par recombinaison homologue, il y a des évidences démontrant que l'expression de *Sfl* dépend de *Lhx9* (8). L'expression de *Sfl* est positivement régulée en partie par *Lhx9* et négativement par *DAX1* et en contre partie, *Sfl* régule positivement l'expression de son répresseur, *DAX1* (9). Ceci indique un contrôle qui assure qu'il n'y aura pas de surexpression de *Sfl*.

DMRT1, un gène se trouvant sur le chromosome 9, est essentiel pour la fonction des gonades mâles. Des délétions d'une région du chromosome 9 comprenant le gène *DMRT1* sont associées avec des réversions sexuelles (10), suggérant un rôle pour *DMRT1* dans le développement gonadique mâle, bien que les responsables de ces réversions pourraient être d'autres membres de la famille *DMRT*. Similairement chez la souris, lorsque le gène *Dmrt1* est retiré, les souris montrent des erreurs de fonction testiculaire et voient leurs cellules germinales mourir (11). Les malformations suite à la délétion de *Dmrt1* ne sont observées que chez les mâles et sont apparentes seulement chez les animaux postnataux. De plus, *DMRT1* est soupçonné de jouer un rôle dans la détermination du sexe chez les reptiles et les oiseaux, où il agirait de façon similaire à *SRY* (12;13).

1.3.2 La détermination du sexe par *SRY*

Au cours du développement de l'embryon, les gonades se développent de façon similaire chez les deux sexes, jusqu'au moment où l'expression de *SRY* est déclenchée. À ce moment, si l'expression de *SRY* a bien lieu, la gonade se développe en testicule par la différenciation des cellules de Sertoli et la formation de cordons testiculaires. Toutefois, en absence d'expression de *SRY*, la gonade emprunte une voie moléculaire, dite par défaut, qui mène à la formation de l'ovaire. L'analyse de gonades d'une souris chimère, construite par l'agrégation d'embryons de mâle et de femelle, montre que presque toutes les cellules précurseurs aux cellules de Sertoli contiennent un chromosome Y (14) ce qui suggère que ce sont ces cellules qui expriment *Sry*. Suite à l'expression de *Sry* dans les cellules

précurseurs de Sertoli, on observe une augmentation de la taille de la gonade et une réorganisation des cellules en structures qui ressemblent à des tubes, les cordons testiculaires. *Sry* agit comme un commutateur moléculaire en initiant des procédés de réorganisation cellule-cellule comme le remodelage de la matrice extracellulaire, l'interaction entre cellules, le mouvement cellulaire et la vascularisation. Ces changements apparaissent 12 à 14 heures après le pic d'expression de *Sry*. Ces deux fonctions prêtées à *Sry* (différenciation des cellules de Sertoli et réarrangements cellulaires) sont probablement indissociables car la différenciation totale des cellules de Sertoli pourrait dépendre de la réorganisation structurelle de la gonade (15-17). *Sry* induit aussi la migration de cellules provenant du mésonephros adjacent vers la gonade XY (18). L'expression de *Sry* progresse telle une vague de la partie antérieure vers la partie postérieure du testicule pendant deux jours et *Sry* n'est pas exprimé plus que quelques heures dans chacune des cellules (19). Cela suggère qu'il règne dans la cellule un mécanisme d'activation mais aussi de répression rapide de l'expression de *Sry*. L'expression transitoire de *Sry* montre que chez la souris, bien que ce gène soit responsable de la détermination du sexe, son expression n'est pas nécessaire au maintien du phénotype des cellules de Sertoli.

Il y a au moins trois types cellulaires somatiques qui participent à la différenciation des gonades en plus des cellules germinales : la lignée de cellules supportrices (cellules de Sertoli chez les mâles; cellules folliculaires (granulosa) chez les femelles); la lignée de cellules productrices de stéroïdes (cellules de Leydig chez les mâles; cellules de la thèque et granulosa chez les femelles); et les tissus conjonctifs. La lignée de cellules germinales primordiales est la seule dont l'origine soit clairement établie (20;21). Ces cellules migrent, comme chez tous les vertébrés, à partir du mésoderme extra embryonnaire en passant par l'allantoïde pour aller coloniser la crête génitale. Toutefois, il n'y a pas de rôle connu pour ces cellules dans l'organisation des types cellulaires somatiques des testicules. Les testicules se forment normalement chez des mutants qui n'ont pas de cellules germinales (22). Chez les femelles, par contre, les cellules germinales sont essentielles pour le maintien des structures folliculaires dans l'ovaire (23;24). Les cellules supportrices sont connues pour provenir de la crête génitale.

La synchronisation des évènements du développement gonadique masculin avec l'expression de *Sry* chez la souris est en accord avec un rôle important dans la détermination du sexe. Chez la souris embryonnaire, l'ébauche de l'organe génital-surrénal primordial provient des cellules épithéliales coelomiques et des cellules mésenchymateuses du mésonephros. Les cellules germinales migrent jusqu'à cet organe primordial et se regroupent avec les cellules somatiques qui les entourent pour former la crête génitale, cela peut d'abord être visualisée par un épaissement du mésonephros autour du jour 10 *post coïtum* (dpc). On peut détecter *Sry* dans la crête génitale au jour 10.5 et 11.5 *post coïtum* puis à 12.5 *Sry* n'est détecté qu'à un faible niveau (25). Les premières différences sexuelles au niveau des gonades apparaissent à environ 11.5 jour *post coïtum* alors que les gonades mâles prennent une apparence rayée, probablement dû à la différenciation des cellules supportrices en cellules de Sertoli et à leur alignement en cordons testiculaires, qui deviendront les tubules séminifères. Les ovaires sont formés 2 à 3 jours plus tard chez l'embryon femelle, où les cellules de granulosa et les cellules de la thèque sont formées, le tout agissant comme une voie par défaut initié en l'absence du signal de la voie de masculinisation.

Chez l'humain, comme c'est aussi le cas chez la souris, le moment de la détermination des testicules est défini par l'apparition de l'ARNm de *SRY*. La crête gonadique humaine se forme après environ 33 jours de gestation, et *SRY* est détecté au jour 41 dans les embryons XY. Le pic de *SRY* coïncide avec le moment où l'on commence à identifier les cordons testiculaires et a lieu au jour 44 de gestation (26). L'expression de *SRY* n'est pas arrêtée dans les testicules humaines, contrairement à chez les souris, *SRY* continue d'être exprimé même chez l'adulte (26). Au jour 52 de gestation, les cellules germinales sont entourées par les cellules de Sertoli qui continuent d'exprimer *SRY*, ce qui suggère d'autres rôles pour *SRY*, par exemple au cours de la spermatogenèse.

Toujours chez l'humain, la protéine *SRY* a été détectée dans le noyau des cellules de Sertoli de testicules embryonnaires ce qui est en accord avec son rôle de facteur de transcription. Des analyses d'expression d'ARN suggèrent que *SRY* est exprimé dans une panoplie de tissus adultes et de lignées cellulaires humaines (27;28).

Chez le porc, l'expression de *SRY* peut être détectée à partir du jour 21 suivant l'insémination et se poursuit jusqu'au-delà du jour 35 après l'insémination (29;30). Une étude chez des souris transgéniques, utilisant le gène rapporteur GFP (green fluorescence protein) sous le contrôle d'une séquence de 4,5kb la région 5' du gène *SRY* porcin, montre que, chez les individus XY, il y a apparition de fluorescence dans la crête génitale à partir du jour 11.5 embryonnaire jusqu'au jour 15.5 embryonnaire (31). Toutefois, aucune autofluorescence n'a été détectée chez les embryons de souris XX. La présence de fluorescence exclusive aux souris mâles démontre que le promoteur de *SRY* porcin ne peut être activé que dans un environnement testiculaire. On pourrait croire que cette activité promotrice ne pourrait avoir lieu qu'en présence de *SRY*, car ces individus possèdent un chromosome Y, or une autre expérience montre de l'autofluorescence chez les souris XX *odsex*, qui possèdent le transgène GFP, sous le contrôle de la portion 4.5 kb en 5' du gène *SRY* porcin (31). Les souris *odsex* démontrent un dérèglement de l'expression de *Sox9* et possèdent un phénotype constitutif mâle nonobstant du sexe génotypique, ce qui conduit à la formation d'animaux XX mâles en absence de *Sry*. Il est surprenant de ne voir aucune autofluorescence dans les gonades des souris femelles dans cette étude, car tous les éléments nécessaires à l'activation du promoteur *Sry* devraient se trouver aussi chez la femelle. Cette observation pourrait être dû à l'aspect inter-espèce de l'expérience, il se pourrait qu'il y ait un contrôle d'expression de *Sry* différent entre la souris et le porc. En effet, il a été précédemment démontré que le transgène GFP sous le contrôle de la région de 8 kb en 5' du gène *Sry* de la souris était exprimé autant chez les souris XY que les souris XX (32).

Ces nombreuses expériences font de *SRY*, le gène primordial de la détermination du sexe. Les conséquences de l'expression de *SRY* se retrouvent aux niveaux moléculaire et cellulaire des gonades. La différenciation des cellules de Sertoli et leur assemblage en cordons testiculaires sont des conséquences directes de l'expression de *SRY*. Suite à l'expression de *SRY*, il se produit aussi la différenciation des cellules de Leydig, dans lesquelles a lieu la stéroïdogénèse. Dans la cascade enzymatique de la stéroïdogénèse, il y a production de deux hormones importantes pour l'obtention du sexe phénotypique mâle. La première est la testostérone qui est nécessaire pour le développement des canaux de Wolff, qui se deviendront l'épididymes, les canaux déférents et les vésicules séminales, et la

deuxième hormone, dérivé de la testostérone, le dihydrotestostérone est responsable de la virilisation des organes masculins externes et de la prostate.

Bien entendu, ces actions exercées par SRY ont besoin non seulement d'une protéine intacte aux fonctions conservées, mais aussi d'une régulation transcriptionnelle précise du gène. SRY régulerait ainsi l'expression de gènes cibles. Les gènes cibles de SRY restent encore inconnus, même si beaucoup d'efforts sont portés pour les découvrir. Toutefois, comme il arrive souvent en science, c'est par inadvertance qu'un gène cible potentiel a été découvert.

1.3.2.1 SOX9

Une famille de gènes a été clonée grâce à leur homologie de séquence à la boîte HMG de SRY. D'ailleurs on leur a donné les noms de protéines Sox, (SRY-related HMG-box) parce qu'ils contiennent tous une région semblable à la boîte HMG de SRY. Une de ces protéines, Sox9, est associée à la dysplasie campomelique (CD) ainsi qu'à des réversions sexuelles autosomiques (33). Cette protéine est détectée dans le complexe urogénital des souris des deux sexes à des niveaux semblables jusqu'au jour 10.5 dpc. À 11.5 dpc, l'expression de *Sox9* augmente chez les mâles et diminue chez les femelles. La délétion et certaines mutations de *SOX9* causent une réversion sexuelle (34-36).

En tentant de rétablir le phénotype sauvage des souris albinos, une équipe a fait une découverte surprenante. En effet, lors de l'intégration au génome, le transgène susceptible du rétablissement des souris albinos s'est inséré dans une séquence inhibitrice de l'expression du gène *Sox9*. Ainsi, l'expression de *Sox9* devient constitutive. Les souris XX transgéniques exprimant *Sox9* au niveau de la crête génitale arborent un phénotype mâle, et ce même en absence de SRY (37). Ceci suggère que l'expression de *Sox9* est suffisante pour la détermination du sexe et qu'il serait un gène cible direct ou indirect de SRY. En contre partie, une étude montre que Sox9 transactive le promoteur *SRY* porcine (31). L'activité transcriptionnelle de Sox9 est aussi responsable en partie de la régulation de l'expression de MIS, l'hormone anti-Müllérienne. Le rôle de MIS est de faire régresser les canaux de Müller, canaux qui deviennent le tractus génital féminin lorsque pleinement

développés. Toutefois, la surexpression de MIS contrevient dans la stéroïdogénèse au niveau du cytochrome P450 C17 α -hydroxylase dans les cellules de Leydig (38).

1.4 SRY : Structure protéique et régulation génique

1.4.1 La protéine SRY

SRY encode une protéine qui possède un domaine de liaison à l'ADN sous forme de boîte HMG (High-Mobility-Group) qui, croit-on, régule la transcription des gènes impliqués dans la détermination du sexe. (4;39;40). La région de la boîte HMG de *SRY* est hautement conservée entre les différentes espèces de mammifères qui ont été jusqu'à lors séquencées. Les mutations trouvées dans le domaine de liaison à l'ADN du gène *SRY* humain, qui conduisent à une réversion sexuelle, appuient fortement les évidences que *SRY* serait le gène de la détermination du sexe. Beaucoup de mutations se trouvant à l'intérieur du domaine HMG de *SRY* et causant des réversions sexuelles ont été répertoriées. Une mutation se trouvant en 5' du gène est aussi connue, mais aucun polymorphisme du domaine HMG n'est connu pour les hommes normaux.

Si les protéines *SRY* des différentes espèces possèdent le domaine HMG en commun, leur similitude se limite à ce niveau car il n'y a pas, ni en acides nucléiques ni en acides aminés, de séquences conservées en dehors du domaine HMG entre les espèces. Par exemple, la région répétée riche en glutamine, localisée en C-terminal du domaine HMG de la protéine de souris, est inexistante dans la protéine *SRY* humaine. Des expériences ont démontré que la région répétée riche en glutamine était essentielle pour l'activation d'un gène rapporteur cible dans des cellules hétérologues. Les mêmes expériences produites avec la protéine *SRY* humaine démontrent que la protéine humaine était incapable d'activer le gène cible (41). Il se peut que la protéine humaine recrute des protéines associées additionnelles et, qu'ensemble, elles agissent en tant qu'activateur ou en tant que répresseur. Les régions en dehors du domaine HMG ont changé rapidement (42-44), ce procédé pourrait exercer une mise au point des interactions avec d'autres protéines qui se différencieraient d'une espèce à l'autre. En utilisant l'ADN du domaine HMG de *Sry*, le criblage d'une librairie d'ADN complémentaire (ADNc) de souris au jour 8.5 *post coitum*

révèle toute une famille de gènes qui possèdent un domaine HMG similaire à celui de Sry. Ces gènes, appelés *SOX* (SRY-related HMG box), démontrent une homologie de 60% dans le domaine de liaison à l'ADN, la boîte HMG. De plus, tous les membres de la famille *SOX* reconnaissent et se lient à la même séquence d'ADN cible dans les essais *in vitro* de sélection de sites, toutefois, avec des affinités relatives à chacun. Plusieurs de ces protéines ont des rôles spécifiques dans le développement et leur spécificité dépendrait de leur profil d'expression dans des types cellulaires spécifiques, de leur localisation et de la nécessité d'interagir avec d'autres facteurs afin d'assurer leur fonction régulatrice.

Le cadre de lecture ouvert de *SRY* humain est contenu dans un seul exon et code pour une protéine de 204 acides aminés. Il y a trois régions principales chez la protéine *SRY*. La portion centrale consiste en un domaine de liaison à l'ADN sous forme de boîte HMG de 79 acides aminés. Cette boîte HMG se lie à l'ADN par le sillon mineur en reconnaissant le motif A/TAACAAT/A (45) et cette liaison provoque un repliement d'environ 80 degrés dans la structure de l'ADN. La portion centrale contient aussi deux signaux de localisation nucléaire. Une comparaison de la séquence en acides aminés des domaines HMG de *SRY* humain, souris, lapin, wallaby et chèvre démontre une similitude de 70%. La portion N-terminale de la protéine ne possède pas de structure évidente, mais la phosphorylation d'une séquence se trouvant dans ce domaine amplifie l'activité de liaison à l'ADN (46). La région C-terminale de *SRY* humain n'a pas non plus de structure évidente ou conservée, sauf pour les sept derniers acides aminés qui interagissent *in vitro* avec des protéines qui possèdent un domaine PDZ (47). Chez la souris, on retrouve dans la portion C-terminale une région riche en glutamine qui est absente chez les autres mammifères et même chez certaines sous-espèces de souris. Les séquences d'ADN du gène *SRY* de différentes espèces de mammifères ont donc divergé rapidement (44) et ce manque de conservation pourrait refléter l'évolution de diverses fonctions de *SRY* autres que la détermination du sexe, par exemple dans la spermatogenèse ou dans le fonctionnement du cerveau.

La liaison à des séquences spécifiques d'ADN, dont le motif principal est AACAAAT, est une caractéristique de la famille des protéines *SOX*. L'affinité que démontre *SRY* à se lier à l'ADN dépend de la séquence et plusieurs études ont été conduites à ce

propos (48;49). Le repliement dans l'ADN, causé par la liaison de SRY au sillon mineur, est associé avec l'insertion de la chaîne latérale non polaire de l'isoleucine 68 entre les paires de base. Cette insertion libère l'ADN de son entassement mais ne défait pas les liaisons entre les bases. Chez certains patients XY qui démontrent une malformation gonadique, on observe une substitution de l'isoleucine 68 pour une thréonine ce qui résulte en une baisse d'affinité de 50 fois pour la liaison de SRY à l'ADN. La fonction précise du repliement causé par l'action de la protéine n'est pas connue, mais il a été proposé que le repliement établirait une structure particulière dans l'ADN de la chromatine. En effet, une étude sur la chromatine a démontré que SRY était capable de déplacer un nucléosome sur le promoteur *fra-2* (50).

1.4.2 Les mutations de SRY

Des mutations ponctuelles ou des délétions dans SRY sont associées avec environ 15% des réversions sexuelles retrouvées chez les femmes XY (51). Le séquençage d'ADN a démontré que SRY se retrouvait chez la plupart des mâles XX. Ces observations supportent, une fois de plus, le fait que SRY est le facteur de détermination des testicules, mais suggèrent aussi qu'il existe des mutations dans d'autres gènes qui affectent la détermination du sexe. Presque toutes les patientes femmes XY qui possèdent des mutations dans *SRY* montrent une malformation complète des gonades. Phénotypiquement, ces patientes se développent comme des femmes normales avec des organes génitaux d'apparence femelle autant intérieurement qu'extérieurement. Toutefois, il subsiste une perte de fonction ovarienne ce qui conduit à l'amenorrhée. Dans environ 50% des cas de tumeurs dans les gonades on peut relier le symptôme à la malformation gonadique, ce qui conduit les médecins à retirer les gonades par chirurgie.

Ce ne sont pas toutes les mutations qui causent une réversion sexuelle complète, il existe des cas de mutations familiales de *SRY* où le père fertile d'un individu XY femelle possède aussi la mutation dans *SRY*.

Beaucoup de mutations causant des malformations gonadiques ont été caractérisées et, dans plusieurs des cas, les activités de liaison et de repliement de l'ADN étaient réduites (39;49;52;52-56). Arbitrairement, il est possible de classer les mutations de *SRY* selon trois groupes : celles affectant l'efficacité de la liaison à l'ADN mais sans affecter la fonction de repliement de l'ADN, celles qui affectent autant la fonction de liaison à l'ADN que celle du repliement de l'ADN et finalement celles qui n'affectent que la fonction de repliement de l'ADN. Ces observations suggèrent que les fonctions de *SRY* de liaison à l'ADN et de repliement de l'ADN sont essentielles à la détermination testiculaire, mais semblent partiellement indépendantes. Il existe aussi des femmes XY dont les mutations dans *SRY* n'affectent ni sa fonction de liaison à l'ADN ni sa fonction de repliement de l'ADN *in vitro*, ce qui suggère d'autres fonctions jusqu'alors inconnues de *SRY*. Une de ces mutations (R133W) inhibe l'interaction entre *SRY* et l'importine β , une protéine nécessaire pour l'importation de *SRY* au noyau (56). Il est fort probable qu'il reste à découvrir une panoplie de protéines interagissant avec *SRY* et que certaines mutations du gène apportent un dérèglement au niveau de l'interaction entre *SRY* et ces protéines. Il ne faut pas, non plus, oublier que le site de liaison à l'ADN *in vivo* de *SRY* peut différer de la séquence consensus utilisée dans les expériences de liaison à l'ADN *in vitro*.

On ne peut pas se limiter à connaître la protéine *SRY* et à étudier les conséquences de ses mutations pour comprendre pleinement son rôle dans la détermination du sexe, il est tout aussi nécessaire de s'intéresser à la régulation transcriptionnelle de gène *SRY*.

1.4.3 La régulation transcriptionnelle de *SRY*

Le lieu et le moment de l'expression de *SRY* sont cruciaux pour la détermination du sexe des mammifères. Malheureusement (ou heureusement), il reste beaucoup à apprendre sur la régulation transcriptionnelle de *SRY*. On peut expliquer ce retard par le fait que les régions 5' des gènes *SRY* des différentes espèces sont considérablement variables dans leur séquence, il est donc difficile d'établir des liens entre les études sur les différents promoteurs *SRY*. Toutefois, la comparaison de régions régulatrices en 5' du gène *SRY* et de promoteurs de 10 espèces de mammifères a tout de même révélé des éléments régulateurs

potentiels présents dans toutes les espèces étudiées (AP1, Barbie, GATA, Gfi1, cMyb, vMyb, NF1, Oct1, Sp1 et SRY) sans toutefois de conservation au niveau de leur position dans le promoteur (57;58). De plus, il a été démontré que le transgène de *SRY* humain ne causait pas de réversion sexuelle chez la souris, mais lorsque l'on place la séquence codante de *SRY* humain en aval du promoteur *Sry* de souris, il y avait bel et bien réversion sexuelle chez la souris transgénique (59). Dû aux différences entre les espèces, la régulation de *SRY* a été étudiée simultanément dans le système humain et souris.

C'est avec un fragment génomique de 14kb contenant la portion codante de *Sry* et 8 kb de région 5' qu'a été démontré pour la première fois que le transgène de *Sry* était capable d'induire la formation des testicules chez les souris XX (2). L'expression de *Sry* à partir du fragment de 14kb est plus répandue et persiste plus longtemps que le gène *Sry* endogène (32;60;61). Ceci indique que le transgène est sujet à des effets dû à sa position dans le génome ou à un manque des répresseurs agissant en *cis* qui limiterait temporellement et localement son expression. Dans les deux cas, il semble qu'il ne soit pas nécessaire que l'expression de *Sry* soit restreinte localement pour la détermination du sexe chez la souris. De façon surprenante, une construction avec une délétion de la séquence 5' ne laissant que 57 pb en amont du site d'initiation de la transcription est toujours capable d'induire la formation de testicules (61). Habituellement, les éléments des promoteurs sont indiqués en référence au site d'initiation de la transcription, toutefois, pour l'étude des promoteurs *SRY*, on utilise le codon d'initiation de la traduction comme point de référence étant donné que plusieurs sites d'initiation de la transcription ont été trouvés sur les promoteurs. Une étude a identifié deux sites d'initiation de transcription pour *SRY* humain à -78 pb et -136 pb (62) et d'autres études décrivent des sites à -91 pb (27;63) et à au moins 410pb plus en amont (27). Chez la souris trois sites majeurs et un mineur d'initiation de transcription ont été décelés entre -269 pb et -256 pb (64).

Quelques mutations en dehors de la séquence codante ont été reconnues pour causer des réversions sexuelles, démontrant l'importance d'éléments de régulation transcriptionnelle pour la détermination du sexe. D'abord, il y a une mutation ponctuelle à la position -2027 pb (65) puis il y a une délétion de 33 kb à 60 kb qui enlève tout ce qui est en amont de la position -1.8 kb. Il existe aussi une délétion de la région qui se trouve à 2 kb

en aval du signal de polyadénylation et s'étend sur 500 pb en s'éloignant du gène (66). Toutefois, on ne peut savoir si ces régions contiennent réellement des éléments de régulation de *SRY* tant que des études ne seront pas menées pour examiner plus en profondeur ces régions.

Il a été démontré que l'expression d'un rapporteur sous le contrôle du promoteur *SRY* humain pouvait être influencée par la liaison des facteurs de transcription SF1, Sp1 et WT1 suggérant ainsi un rôle pour ces facteurs dans l'expression de *SRY*.

1.4.3.1 Régulation de *SRY* par SF1 et Sp1

SF1, abréviation de « Steroidogenic factor 1 », est un facteur de transcription faisant partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et possédant un domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc dans sa portion N-terminale ainsi qu'un domaine de liaison aux ligands en C-terminal (67). Sp1 est un facteur de transcription ubiquitaire impliqué dans la régulation de plusieurs gènes et qui reconnaît les séquences consensus riches en GC (68). Des retardements sur gel ont montré que Sp1 pouvait se lier aux éléments consensus présents sur le promoteur *SRY* humain à -150 pb et -130 pb (69) et que SF1 pouvait se lier au site consensus à -315 pb (70). Des expériences de cotransfections dans des cellules SL2, lignée cellulaire Schneider de *Drosophile* déficiente en Sp1, démontrent que Sp1 est capable d'activer la transcription d'une construction d'un rapporteur contenant la séquence de *SRY* de -175 à +53. La mutagenèse du site Sp1 à -150 pb abolit de 90% l'expression du gène et l'addition de la mutagenèse du site à -130 pb ne réduit pas davantage l'expression du gène (69). La mutagenèse du site de SF1 du promoteur *SRY* humain chez les cellules NT2D1, cellules embryonnaires multipotentes qui proviennent d'un carcinome, réduit l'expression du gène de 50% (70).

Le traitement à l'AMP cyclique (AMPC) des cellules NT2D1 et des cellules de Sertoli cultivées à partir de testicules postnataux abolit l'expression de *SRY*. L'analyse de co-immunoprécipitation des cellules NT2D1 démontre que les facteurs Sp1 et SF1

interagissent (70). Suite au traitement à l'AMPc, il y a une phosphorylation du domaine de liaison aux ligands de SF1 médiée par PKA, ce qui abolit sa liaison à l'ADN et son interaction avec Sp1. SF1 et Sp1 semblent devoir coopérer pour activer le promoteur *SRY* via une interaction directe entre protéines. Cela suggère aussi un rôle de répression de l'expression de *SRY* par la phosphorylation de SF1.

Des récents travaux effectués auxquels j'ai participé indiquent la présence de deux sites de liaison Sfl sur le promoteur *SRY* du porc mais une expérience de retardement sur gel ont montré que Sfl peut seulement se lier au site en position -1369 pb (71). De plus, en cotransfection, il a été démontré que l'inactivation du site Sfl en position -1369 pb inhibe l'activation du promoteur *SRY* porcin par le facteur de transcription Sfl dans les cellules CV-1.

Il semble donc que SF1 soit requis pour l'expression de *SRY* humain. À l'appui de cette hypothèse, on retrouve une mutation naturelle dans le gène *Sfl* responsable d'une réversion sexuelle (72). Il est toutefois difficile de déterminer si la réversion sexuelle est dû à un effet direct sur *SRY*, car SF1 est impliqué dans l'expression d'autres gènes importants pour la détermination du sexe et pour la différenciation sexuelle (6;73-78).

1.4.3.2 Le dilemme de DAX1

Comme il a été mentionné précédemment, l'expression de *Sfl* est négativement régulée par DAX1 et, en contre partie, Sfl régule positivement l'expression de son répresseur, *DAX1* (9).

DAX1, acronyme de «**D**osage-sensitive sex reversal-**A**drenal hypoplasia congenital critical region on the **X** chromosome, gene **1**», est un gène codant pour un membre atypique de la superfamille des récepteurs nucléaires. *DAX1* est exprimé dans plusieurs tissus endocriniens dont les gonades où il est présent dans les testicules au niveau des cellules de Sertoli et Leydig ainsi que dans les ovaires au niveau des cellules de granulosa et de la thèque. La protéine DAX1 joue un rôle important dans le développement des surrénales et

dans le maintien de la fonction gonadique. Plusieurs mutations de *DAX1* ont été associées aux maladies de l'hypoplasie congénitale des surrénales (AHC) et de l'hypogonadisme hypogonadotrope (HHG) (79;80).

La surexpression de *DAX1* cause la réversion sexuelle mâle en femelle chez les individus XY. Des études démontrent que l'absence de *DAX1* chez les individus XY n'affecte pas la formation des testicules (81), toutefois, des études démontrent que chez les souris *Dax1*^{-Y} mâles, les cordons testiculaires sont désorganisés et incomplets (82). *Wnt4* est essentiel pour la formation ovarienne (83) et signale l'arrêt de la production des cellules de Leydig. En absence de *Wnt4*, il y a réversion sexuelle de femelle vers mâle chez les souris XX (83). *Wnt4* active l'expression de *Dax1* et la surexpression de *Wnt4* ou de *Dax1* contrevient à la formation des testicules. Cet effet pourrait être dû à l'interférence que cause *Dax1* sur l'activité de la protéine *Sf1*. Le niveau adéquat de *DAX1* est nécessaire pour le développement normal des testicules, mais en trop grande quantité, *DAX1* aurait un effet anti-testiculaire.

1.4.3.3 Régulation de *SRY* par *WT1*

WT1 est un gène suppresseur de tumeur de Wilms, un cancer des reins retrouvé chez les enfants. Initialement, le gène *WT1* a été identifié comme étant inactivé lors d'apparitions de tumeur de Wilms (84;85).

Chez les mammifères, le gène *WT1* peut produire plusieurs isoformes de protéine par les processus d'épissage alternatif, de différents sites d'initiation de la transcription et d'édition de l'ARNm (86;87). La séquence codante consiste en 10 exons et la protéine résultante migre aux alentours de 50 kDa. Toutes les isoformes contiennent quatre doigts de zinc C₂H₂ en portion C-terminale et une région riche en proline et en acide glutamique en N-terminal (voir figure 1.2) (86;87). L'épissage alternatif de l'exon 5 ajoute ou enlève 17 acides aminés entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation. Des fonctions de répression transcriptionnelle sont prêtées à *WT1* lorsque ces 17 acides aminés

sont présents (88) bien que la protéine native sans l'exon 5 a déjà été observée ayant une fonction semblable (89). La fonction précise de l'insertion de ces 17 acides aminés reste encore incertaine. Un autre procédé d'épissage alternatif implique l'exon 9 et cet épissage est présent chez tous les vertébrés (86;90). Cet épissage produit deux types de protéines WT1 distingués par l'insertion ou l'omission de trois acides aminés, Lys, Thr et Ser (KTS), entre le troisième et le quatrième doigt de zinc. Cette insertion déränge l'espace critique entre les doigts de zinc, résultant en une perte de fonction de liaison à l'ADN aux sites consensus de reconnaissance de WT1 (91).

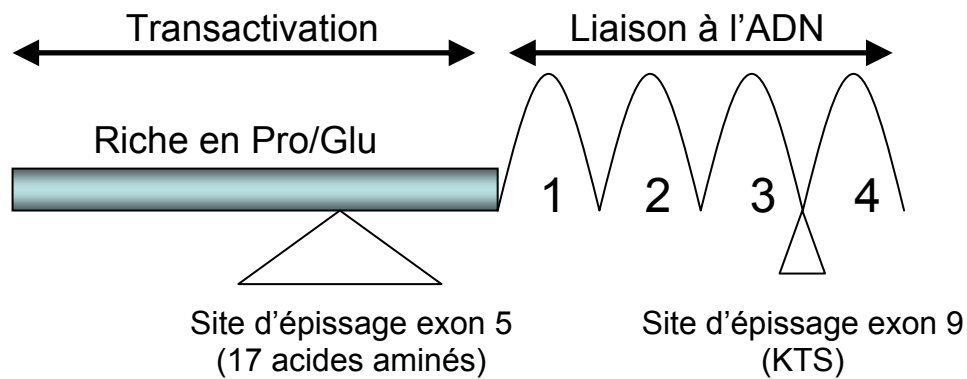


Figure 1.2 Schéma de la protéine WT1 mettant en évidence deux sites d'épissage alternatif impliqués dans des maladies liées à des mutations du gène WT1.

L'analyse des isoformes (-KTS) et (+KTS) de WT1 démontre qu'ils ont des fonctions différentes. WT1 (-KTS) peut se lier à l'ADN sur des éléments consensus et agit comme un facteur de transcription classique dans des essais de transfections. L'isoforme WT1 (+KTS) pourrait être impliqué dans la production ou la modification de l'ARNm car il est connu qu'il peut se lier à l'ARN et qu'il colocalise avec les complexes d'épissage (92).

Le ratio des isoformes (-KTS)/(+KTS) est crucial. Le syndrome de Frasier, caractérisé par des erreurs de développement des reins et des gonades, est causé par le déséquilibre entre les isoformes (-KTS) et (+KTS). Le syndrome de Frasier est causé par une mutation de la lignée germinale dans le site donneur d'épissage de l'exon 9, ce qui est associé avec une réduction d'expression de l'isoforme WT1(+KTS) (93-95).

D'autres maladies sont associées avec des dérèglements d'expression de *WT1* : les tumeurs de Wilms, le syndrome WAGR (Wilms' tumor, aniridia, genitourinary abnormalities, and mental retardation), et le syndrome de Denys-Drash en sont des exemples. Les tumeurs de Wilms, ou néphroblastome, est un cancer pédiatrique des reins originaire des précurseurs rénaux embryonnaires pluripotents. *WT1* est inactivé dans la lignée germinale des enfants qui possède une prédisposition génétique aux tumeurs de Wilms, de plus, *WT1* est mutés chez environ 15% des tumeurs de Wilms sporadiques (96). Le syndrome de WAGR est caractérisé par la formation de tumeurs de Wilms, par des malformations de l'iris et du système urogénital ainsi que par le retard mental. L'étude de ce syndrome a débuté lorsque les chercheurs se sont aperçus que les symptômes de l'aniridia et de tumeurs de Wilms survenaient ensembles plus souvent que ce qu'il n'était prévu statistiquement, suggérant que les gènes responsables devaient être liés (97). En effet, *Pax6*, un gène essentiel pour la formation normal de l'œil, et *WT1* résident sur un même locus sur le chromosome 11p13, (84;85) où des délétions cytogénétiques étaient retrouvées chez les enfants atteints du syndrome WAGR (98-100). Pour le syndrome de Denys-Drash (DDS), une panoplie de symptômes sont retrouvés, incluant le pseudohermaphrodisme, la sclérose mesangiale rénale et la prédisposition aux tumeurs de Wilms (101). Les malformations urogénitales sont plus sévères chez le syndrome de Denys-Drash que chez le syndrome WAGR. Les mutations de *WT1* responsables de la maladie de Denys-Drash sont habituellement ponctuelles et la plus connue est le changement d'acide aminé arginine en tryptophane située au codon 394 (102-104). Il est possible que ces mutations ponctuelles apportent un phénotype de gain de fonction qui change l'affinité à l'ADN ou qui modifie la spécificité de gènes cibles. Toutefois, un cas rare du syndrome de Denys-Drash impliquant la troncation en N-terminal de *WT1* suggère un mécanisme de perte de fonction (105;106). La dimérisation de *WT1* a lieu via son domaine N-terminal, cela pourrait être une perte de

fonction responsable du syndrome, du moins pour le cas de la mutation de troncation en N-terminal (107-110).

Les anomalies de différenciation sexuelle évidentes chez les patients ayant le syndrome de Denys-Drash démontrent le rôle critique de WT1 dans le développement rénal et parfois même dans le développement gonadique. En plus de tumeurs de Wilms, les enfants atteints de DDS risquent de développer des tumeurs de cellules germinales indifférenciées, appelées gonadoblastomes, en conséquence de l'absence de différenciation gonadique (101). En contraste avec le DDS, le syndrome de Frasier, bien qu'il soit associé avec des réversions sexuelles et des anomalies rénales, ne procure pas une prédisposition apparente aux tumeurs de Wilms (93-95). Comme susmentionné, le syndrome de Frasier est lié à une mutation intronique qui altère le ratio d'isoformes de WT1. La dissociation évidente entre les conséquences développementales et tumorigéniques des altérations de *WT1* dans la lignée germinale pourrait refléter le fait que les isoformes de WT1 possèdent des fonctions qui se recoupent mais qui sont non identiques. L'altération de leur niveau d'expression relatif pourrait mener à un développement génito-urinaire aberrant, mais l'inactivation complète du gène pourrait être requis pour la tumorigénèse.

WT1 est important tout au long du développement des gonades. D'abord lors de la formation de la gonade indifférenciée, en absence de WT1 il n'y aura pas de formation normale de l'organe gonadique (7). WT1 active l'expression de SF1 qui est, lui aussi, un acteur essentiel du développement gonadique. Il a aussi été proposé que WT1 aurait un rôle dans l'activation du gène *MIS*, l'hormone anti-Müllerienne, un gène essentiel la différenciation sexuelle (111).

Pour investiguer le rôle de WT1 dans la détermination du sexe, une équipe a étudié l'effet de WT1 sur l'expression de *SRY* humain dans la lignée cellulaire NT2D1, une lignée humaine de tissus testiculaire (112). L'expression endogène de *SRY* est augmentée lors de la transfection stable d'un vecteur d'expression contenant la séquence codante pour l'isoforme WT1 (-KTS), mais reste au même niveau avec un vecteur codant pour l'isoforme WT1 (+KTS). Dans des essais de rapporteurs, l'activation du promoteur *SRY* par WT1(-KTS) requiert la présence d'un élément de liaison consensus se trouvant de -78 à -87 pb du codon initiateur ATG. D'autres études ont démontré que WT1(-KTS) augmentait

l'expression d'autres gènes endogènes tel que *BCL2* (un inhibiteur d'apoptose), *CDKN1A* (un inhibiteur de kinase cycline dépendante), amphiréguline (un facteur de croissance épidermique), et *DAX1* (qui, en concentration adéquate, est un facteur essentiel pour la formation des cordons testiculaire).

L'inactivation de *Wt1* chez la souris abolit complètement le développement des reins et des gonades (7;113). En contre partie, l'inactivation sélective de l'isoforme *Wt1(-KTS)* procure des gonades plus petites mais qui contiennent les marqueurs de spécificité mâle (114). De son côté, l'inactivation de *Wt1(+KTS)* cause la réversion sexuelle complète ainsi qu'une diminution radicale de l'expression de *Sry* chez les souris (114). Dans les deux cas, les souris meurent peu de temps après la naissance dû à des déficiences des reins. Le phénotype de l'inactivation de *Wt1(+KTS)* rejoint celui du syndrome de Frasier, syndrome causé par une mutation diminuant la production de *WT1(+KTS)*. Les résultats obtenus suite aux inactivations spécifiques des isoformes (-KTS) et (+KTS) indiquent que ces deux isoformes sont requises pour le développement des gonades, mais que seul (+KTS) est nécessaire pour la détermination du sexe masculin.

1.4.3.4 Régulation de *SRY* par *GATA-4* et *FOG2*

Un autre acteur crucial dans le développement des gonades est *GATA-4*, un membre de la famille *GATA*.

La famille des facteurs de transcription *GATA* est composée de six membres, *GATA-1* à *GATA-6*, reconnaissant et se liant tous à la séquence d'ADN *WGATAR* (115;116). Ces facteurs, retrouvés chez tous les vertébrés, sont essentiels au développement d'une panoplie d'organes et de tissus. Ils assurent la différenciation spécifique de nombreux types cellulaires par l'intermédiaire d'interaction directe ou indirecte avec des co-facteurs d'expression spécifique. Les protéines *GATA* sont subdivisées en deux sous-groupes en accord avec leur profil d'expression, *GATA-1*, -2 et -3 sont principalement exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques où ils régulent l'expression de gènes de différenciation spécifique chez les lymphocytes T, les cellules érythroïdes et les

mégacaryocytes (117). GATA-4, -5 et -6 sont exprimés dans une variété de tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme comme le cœur, le foie, les poumons, les gonades et les intestins où ils jouent des rôles de régulation d'expression de gènes spécifiques aux tissus (118-123).

Tous les facteurs de transcription GATA possèdent deux doigts de zinc, au motif Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys, à l'aide desquels ils se lient à l'ADN, leur permettant de transactiver différents promoteurs (77;118-126). Les doigts de zinc constituent la région dont la séquence en acides aminés est la plus conservée entre les membres de la famille GATA.

Chez la souris, Gata-4 est le seul facteur GATA dont l'expression dans la crête génitale coïncide avec celle du gène *Sry* (31;127). La protéine Gata-4 est détectée aussi tôt qu'au jour embryonnaire 11.5 dans les gonades indifférenciées des embryons XX et XY. Au jour embryonnaire 13.5, alors que la gonade masculine en développement prend l'apparence lignée caractéristique, on retrouve encore abondamment de Gata-4. Dans les cordons testiculaires, la protéine Gata-4 est retrouvée exclusivement dans le noyau des cellules de Sertoli nouvellement différenciées, et aucune présence de Gata-4 n'est détectée au centre des cordons, au sein des cellules germinales. Gata-4 est aussi fortement détectée au jour embryonnaire 13.5 dans une sous population de cellules interstitielles des testicules, soit les précurseurs de cellules de Leydig (127).

GATA-2 est aussi exprimé au niveau des gonades fœtales de souris, entre les jours embryonnaires 10.5 à 15.5, mais seulement dans les cellules germinales des souris XX (128). GATA-5 et GATA-6 sont tous les deux exprimés dans le système urogénital des souris, mais seulement aux étapes fœtales tardives et postnatales (121). Finalement, GATA-1 est aussi retrouvé dans les cellules de Sertoli mais son expression se limite qu'aux testicules postnataux (129).

GATA-4 est déjà connu pour ses rôles dans le développement et la différenciation des gonades. Une étude récente a démontré que GATA-4 régule l'expression de *DMRT1*, un gène exprimé seulement dans le testicule et important pour le bon fonctionnement de ce tissu (130). On sait aussi, que GATA-4 régule l'expression du gène *MIS*, une action qu'il

n'accomplie pas en solitaire (131). En effet, les protéines GATA agissent toujours en coopération avec des co-facteurs dont l'expression spécifique, en lieu et en temps, circonscrit la fenêtre d'expression des gènes cibles, soit en agissant comme co-activateur ou comme répresseur. Un des co-facteurs importants de GATA-4 est FOG2 (Friend of GATA), qui est exprimé, entre autre, au niveau du cœur et des tissus nerveux. Fog2 est essentiel au développement du cœur chez les souris et, plus au niveau du présent sujet, Fog2 a aussi été détecté dans les gonades en développement de souris au jour E11.5 (132). Bien d'autres facteurs peuvent interagir avec les facteurs GATA : Nkx2.5, NFATc4, MEF-2, C/EBP β et SF1 n'en sont que quelques exemples (131;133-138).

Il est impossible de vérifier l'effet de Gata-4 sur la détermination du sexe par l'inactivation complète du gène, car en absence de Gata-4, l'organisme meurt de défaillance cardiaque aux jours E7.0 à E9.5, soit avant l'étape de la détermination du sexe. Pour cette raison, une équipe a produit des souris transgéniques possédant une mutation sur Gata-4 inhibant son interaction avec son co-facteur Fog2, mais permettant la survie de l'organisme au-delà de l'étape de détermination du sexe (139). La mutation de Gata-4 utilisée pour inhiber son interaction avec Fog2 se situe à l'acide aminé 217 et résulte en une substitution d'une valine en glycine. Un autre type de souris transgéniques a été produit dans cette expérience, ces souris possédaient une inactivation complète du gène *Fog2*. Les souris Gata^{ki/ki}, possédant la mutation V217G, meurent au jour E13.5 d'une anomalie cardiaque. Les souris Fog2^{-/-} meurent aussi d'une anomalie cardiaque mais quelques jours plus tard, soit à E17.5. Ces souris, bien qu'elles aient une mort précoce, permettent d'étudier le rôle de l'interaction entre Gata-4 et Fog2 dans la détermination du sexe car l'expression du gène *Sry* débute vers le jour E11.5 chez la souris.

L'observation initiale des testicules de souris Fog2^{-/-} XY au jour 17.5 du développement démontre des malformations évidentes. Les gonades mutantes de ces souris ressemblent davantage à des gonades normales XX qu'à des gonades d'organisme XY. L'analyse histologique confirme que les cordons testiculaires sont absents chez les souris Fog2^{-/-} XY. Des examens minutieux révèlent que les gonades mutantes XX et XY se ressemblent mais sont différentes des gonades XX et XY normales (139). Ensemble, ces

observations suggèrent que *Fog2* est requis pour le développement de l'ovaire et du testicule.

L'examen de la crête urogénitale XX et XY au jour E11.5 des deux types d'embryons, *Fog2*^{-/-} et *Gata-4*^{ki/ki}, montre que le développement de la crête génitale semble normal jusqu'à ce stade. L'expression de *Sf1* et *Wt1* est détectée dans les gonades mutantes au jour E12.5, toutefois, il n'y a pas d'augmentation d'expression de ces gènes comme il est détecté dans les cellules pré-Sertoli de gonades normales. En fait, le profil d'expression de ces protéines ressemble à celui observé chez la gonade normale XX.

Les souris *Fog2*^{-/-} et *Gata-4*^{ki/ki} démontrent aussi des problèmes au niveau de la formation des cordons testiculaires. Au jour E13.5, on ne retrouve toujours pas de développement des cordons testiculaires. Cette observation corrèle bien avec le fait que l'expression de *Sry* est diminuée de 75% au jour E11.5 chez les deux types de souris mutantes. L'expression des gènes *Sox9*, *Mis* et *Dhh*, gènes qui sont en aval de *Sry* dans la voie de la détermination du sexe, est absente dans les gonades des souris mutantes *Fog2*^{-/-} et *Gata-4*^{ki/ki} au jour E13.5.

L'ensemble des résultats de cette étude démontre que *Gata-4* possède un rôle évident dans l'expression de *Sry* et, par le fait même, dans la détermination du sexe. GATA-4 est connu pour réguler l'expression de plusieurs gènes gonadiques dont les promoteurs contiennent des éléments GATA consensus. Les promoteurs *SRY* de plusieurs espèces de mammifères contiennent des sites de liaison consensus aux protéines GATA. Conjointement, la présence ubiquitaire d'éléments GATA dans les promoteurs *SRY* et l'observation d'une réduction d'expression de *Sry in vivo* chez les souris *Fog2*^{-/-} et *Gata-4*^{ki/ki} suggèrent que l'étude de la régulation transcriptionnelle de *SRY* par GATA-4 serait un complément indispensable pour la compréhension de la détermination du sexe chez les mammifères. Cela ajouterait une pièce du casse-tête de la voie de signalisation moléculaire du développement sexuel des mammifères (Voir figure 1.3).

1.5 Hypothèse de travail

Puisque GATA-4 se trouve au même moment que SRY dans la gonade indifférenciée, je propose un rôle important pour GATA-4 dans l'activation du promoteur *SRY*. Toutefois, sachant que GATA-4 se trouve aussi dans une panoplie de tissus où *SRY* n'est pas exprimé, j'ai élaboré des expériences de coopération transcriptionnelle entre GATA-4 et WT1, qui est déjà connu pour activer *SRY*, dans le contexte des promoteurs *SRY* porcine et humaine. Ces expériences ont été conduites chez ces deux espèces afin de vérifier si le mécanisme de régulation transcriptionnelle du gène *SRY* est conservé entre les espèces.

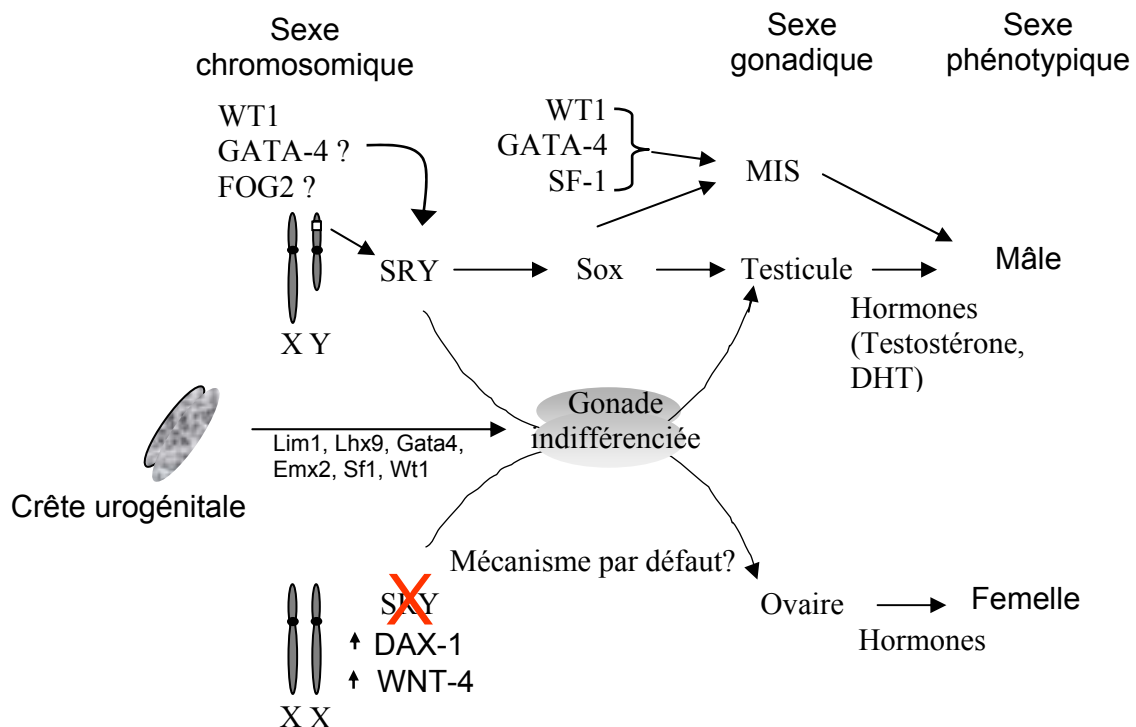


Figure 1.3 Voie de signalisation moléculaire du développement sexuel des mammifères.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

2.1 Clonage des différents délétants des promoteurs *SRY* porcin et humain.

2.1.1 Amplification de fragments des promoteurs par PCR.

Les clones originaux des promoteurs *SRY* de porc et de l'humain ont été fournis par David W. Silversides (Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec).

Des amorces d'oligonucléotides ont été produites afin d'amplifier, par PCR, différentes longueurs des promoteurs. Pour chaque espèce, porc, souris et humain, un oligonucléotide représentant l'extrémité 3' respectif des promoteurs a été utilisé pour l'amplification des délétions de promoteurs, cette amorce contient un site de restriction *KpnI* utilisé pour le clonage dans le vecteur rapporteur. La séquence de l'amorce 3' pour le clonage du promoteur porcin est 5'-GGG GTA CCG AAA AGG GGG AGG AAG CG-3' et celle pour le promoteur humain est 5'-GGG GTA CCT CAA CAC CCC CTC AAC-3' où les sites *KpnI* sont soulignés. Chaque construction de délétion possède leur propre amorce 5' possédant un site de restriction *BamHI* pour des fin de clonage. Les séquences des amorces 5' se retrouvent au tableau 2.1.

Les mélanges des réactions PCR contenaient 50 pmoles de chaque amorce en présence de 50 ng de plasmide contenant le promoteur *SRY* de l'espèce animale désirée, avec 10 ng d'un mélange de nucléotides libres (0.2 mM), 5 µl du tampon 10X (thermoPol buffer, fourni par New England Biolabs), 2 µl de DMSO et 0.5U de polymérase Vent (New England Biolabs) dans un volume total de 50 µl.

Les polymérisations en chaîne ont eu lieu dans une machine Eppendorf (master cycler gradient, Hamburg) suivant le cycle présenté au tableau 2.2.

Tous les fragments ont été insérés en amont du gène luciférase du plasmide pXP1.

Espèce	# GATA	Amorce 5'	Position 5' (pb)	Longueur (pb)	Temps d'élongation
Porc	0	5'-CGG <u>GAT</u> CCA TAA TAA GTA AGC AGT TTT GC-3'	-225	223	1 min
Porc	1	5'-CGG <u>GAT</u> CCT TTT AAT TGA GTG G-3'	-349	347	1 min
Porc	2	5'-CGG <u>GAT</u> CCG CCG CCT GGC AGG C-3'	-510	508	1 min
Porc	3	5'-CGG <u>GAT</u> CCA GGA GTA TGA GGC AAC CTG C-3'	-732	730	1 min
Porc	4	5'-CGG <u>GAT</u> CCT TTG AGT TCC AAG G-3'	-1377	1375	5 min
Porc	5	5'-CGG <u>GAT</u> CCG AAT ACA CTC TCT AGC AC-3'	-3648	3646	5 min
Porc	6	5'-CGG <u>GAT</u> CCA TAT TTT GAT GGG GAT GTC C-3'	-3908	3906	5 min
Porc	7	5'-CGG <u>GAT</u> CCG GAA ATC TGT TCA GTA GTC-3'	-4537	4535	5 min
Humain	0	5'-CGG <u>GAT</u> CCA ATT CAT ATA GCT TTT TGT GTC C-3'	-361	230	1 min
Humain	1	5'-CGG <u>GAT</u> CCT GAT AAA CAA TTC ATA TAG CTT TTT G-3'	-368	237	1 min
Humain	2	5'-CGG <u>GAT</u> CCT GAT AAT GAT AAA CAA TTC ATA TAG C-3'	-374	243	1 min
Humain	3	5'-CGG <u>GAT</u> CCA ATA TGC AGT TAT GTA TGT ATG -3'	-462	331	1 min
Humain	4	5'-CGG <u>GAT</u> CCG GAG GTT GAA CTA AAA GGT G-3'	-875	744	1 min
Humain	5	5'-CGG <u>GAT</u> CCA GAT ACA TGT TTT AAC TTG-3'	-1373	1242	2 min
Humain	6	5'-CGG <u>GAT</u> CCT CTC TCT AGT TCC AGA GC-3'	-1736	1605	2 min
Humain	7	5'-CGG <u>GAT</u> CCA ATT AAG ATA ATA GGT TGT AAG-3'	-1947	1816	2 min
Humain	8	5'-CGG <u>GAT</u> CCC TCT TAA ACT GGA CG-3'	-2198	2067	2 min
Humain	9	5'-CGG <u>GAT</u> CCT GTA ATA TAT GCA TCT GGG-3'	-2947	2816	3 min
Humain	10	5'-CGG <u>GAT</u> CCA AGC TGC AGG ATA AAT GAA C-3'	-4172	4041	5 min
Humain	11	5'-CGG <u>GAT</u> CCG ATC ATG TTT AAA TGC ATC AG-3'	-4585	4454	5 min

Tableau 2.1 Amorces 5' utilisées lors du clonage des différentes délétions des promoteurs *SRY* du porc et de l'humain contenant différents nombres de sites GATA consensus. Les positions relatives à l'ATG ainsi que les longueurs résultantes des fragments clonés sont indiquées. Le temps d'élongation lors de la polymérisation était différent selon la longueur du fragment à amplifier. Le site de restriction *Bam*HI est souligné.

Étape	Température	Temps
	°C	minutes
1 - Dénaturation	94	3
2 - Dénaturation	94	1
3 - Appariement	60	1
4 - Élongation	72	voir tableau 2.1
5 - Répétition du cycle	Retour à l'étape 2 (29 fois)	
6 - Élongation finale	72	5
7	22	Maintenir

Tableau 2.2 Cycle PCR du clonage des différentes délétions des promoteurs *SRY* du porc et de l'humain.

2.1.2 Séparation des fragments et des plasmides par migration sur gel d'agarose.

Une échelle de poids moléculaires et les produits PCR ont été migrés dans un gel d'agarose 1,5% (1,5 g agarose et 50 µg de bromure d'éthidium dans 100ml de tampon TAE 1X) à 100 volts durant 30 minutes. L'exposition aux rayons ultraviolets a révélé les bandes dont la longueur des fragments a été comparée à l'échelle de poids moléculaires. Lorsque les bandes représentaient des fragments de longueurs attendues, le gel a été découpé afin d'en extraire seulement le fragment désiré.

2.1.3 Isolement de l'ADN à partir du gel d'agarose.

La portion du gel d'agarose contenant le fragment du promoteur à cloner a été hachée finement et vortexée vivement pendant 10 min en présence de 400 µl de phénol. Par la suite, l'agarose et le phénol ont été congelés à -80°C durant 20 min puis centrifugés à 13 000 rpm durant 15 min. La portion aqueuse du mélange a été retirée et le reste a été jeté. Des lavages supplémentaires au phénol et au chloroforme ont été effectués sur la solution contenant le fragment PCR isolé de l'agarose. Par la suite, l'ADN a été précipité en

présence de 800 µl d'éthanol 70% et de 1,5 M de NaCl. Une centrifugation de 15 min à 4°C a permis de faire culotter l'ADN et de retirer l'alcool. Après avoir laissé sécher l'ADN, il a été resuspendu dans une solution de TE.

2.1.4 Digestion du fragment et du plasmide rapporteur hôte.

Les différents fragments de promoteur et le plasmide rapporteur ont été digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Kpn*I de la compagnie New England Biolabs (NEB). Pour la digestion des fragments, le mélange de réaction était constitué de 15 µl du fragment, 1.5ul d'enzyme *Bam*HI, 1.5ul d'enzyme *Kpn*I, 3 µl de tampon NEB2, 9 µl d'eau stérile. La réaction a eu lieu durant 2 heures à 37°C et a été suivie de 2 lavages au phénol et au chloroforme afin de retirer les enzymes du mélange.

2.1.5 Ligation des fragments avec le plasmide rapporteur hôte.

La ligation des fragments avec le plasmide rapporteur hôte a été effectuée en utilisant la T4 DNA ligase. 400U de T4 DNA ligase (New England Biolabs) ont été mélangés avec 5 µl du fragment, 50 ng du plasmide rapporteur, 1 µl d'une solution de 10 mM d'ATP et 1 µl du tampon 10X (T4 DNA ligase buffer) fourni par la compagnie New England Biolabs, le tout a été ajusté au volume final de 10 µl avec de l'eau.

Le mélange a été ensuite incubé à 37°C pendant 30 min puis à température ambiante durant 30 min.

2.1.6 Transformation de bactéries compétentes avec les ligations.

10 µl de la ligation ont été ajoutés dans 20 µl de bactéries compétentes XL-1 Bleu et ont été incubés 20 min sur glace. Ensuite, les bactéries et l'ADN ont été incubés dans un bain-marie à 42°C pendant 90 secondes. Après quoi 500 µl de milieu LB ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 37°C pendant une heure. Le mélange a ensuite été étalé sur une

gélose de LB-agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline. La gélose a été incubée pendant la nuit à 37 °C.

Dix colonies isolées ont été piquées et inoculées dans des tubes de 5 ml de LB. Les cultures bactériennes ont été incubées pendant 15 heures à 37 °C avec agitation (250 rpm).

2.1.7 Isolement de l'ADN plasmidique produit par les bactéries.

1.5 ml des cultures bactériennes ont été transférés dans des tubes. Les tubes ont été centrifugés pendant 30 secondes afin de culoter les bactéries. Le surnageant a été retiré puis 100 µl de solution de resuspension a été ajoutée (50mM glucose, 25mM Tris pH 8, 10mM EDTA). Lorsque les bactéries ont été bien resuspendues par agitation vigoureuse, 200 µl de solution de lyse ont été ajoutés (0.2N NaOH, 1% SDS). Les tubes ont été mélangés par quelques inversions et incubés sur glace pendant 5 min. Par la suite, 150 µl d'une solution de neutralisation ont été ajoutés (3M Acétate de potassium, 5M acide acétique). Les tubes ont été mélangés à nouveau par inversions et incubés sur glace pendant 15 min supplémentaires avant d'être centrifugés pendant 15 min.

Les surnageant ont été conservés dans de nouveaux tubes et le culot a été jeté. Un nettoyage de l'ADN au phénol-chloroforme a été effectué avant de faire précipiter l'ADN dans l'éthanol 95%.

Après une incubation à -20°C les tubes ont été centrifugés à 4°C durant 15 min. L'éthanol a été décanté puis le culot d'ADN séché. Finalement, l'ADN a été resuspendu dans 30 µl de TE contenant de la RNase.

2.1.8 Confirmation de la présence du fragment dans le plasmide rapporteur.

2.1.8.1 Digestion

Les différentes préparations d'ADN ont été digérées par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Kpn*I de la compagnie New England Biolabs (NEB). Le mélange de réaction

était constitué de 1 µl d'ADN, 0.5µl d'enzyme *Bam*HI, 0.5µl d'enzyme *Kpn*I, 1 µl de tampon NEB2, 7 µl d'eau stérile. La réaction a eu lieu durant 1 heure à 37°C.

Par la suite, les digestions ont été migrées sur gel d'agarose 1% et les bandes ont été comparées à des marqueurs de poids moléculaire. Les préparations d'ADN ont été qualifiées positive lorsqu'il a eu détection d'un fragment d'une longueur attendue pour la longueur du promoteur inséré.

2.1.8.2 Séquençage par extension d'amorce.

Pour une confirmation supplémentaire, le clone positif retenu a été séquencé par PCR à l'aide d'une amorce représentant une séquence en amont du site d'insertion. Ceci a permis de s'assurer de la présence de l'insertion dans le plasmide.

Quatre réactions PCR ont été utilisées lors du séquençage. Chaque réaction contenait un mélange de nucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) en présence d'un didésoxynucléotide marqué au ³³P (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Le didésoxynucléotide arrête la réaction de polymérisation lorsqu'il est incorporé de façon aléatoire, de sorte que l'on obtient toutes les longueurs de fragment d'ADN selon le dernier nucléotide inséré. La migration sur gel d'acrylamide 6% des quatre réactions PCR a permis la séparation des fragments et le séchage du gel suivi d'une autoradiographie a permis la lecture de la séquence.

2.1.9 Amplification du plasmide dans bactéries XL-1 bleu.

Lorsqu'un clone apparaît positif dans les tests de digestion et de séquençage, il a été transformé à nouveau dans des bactéries compétentes XL-1 bleu puis étalé sur une gélose LB-agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Après incubation de 16 heures à 37 °C, une colonie isolée a ensuite été repiquée dans 2ml de milieu LB, contenant 100 µg/ml d'ampicilline, et a été incubée à 37°C jusqu'à détection de confluence. Alors, 250 µl du

milieu a été transféré dans 250 ml de LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Le milieu a été incubé durant 16 heures à 37°C avec agitation (250 rpm).

Le milieu a été centrifugé à 6000 g à 4°C pendant 15 min afin de jeter la partie liquide et de conserver le culot de bactérie. Ensuite 10 ml de tampon de resuspension (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml de RNase A) ont été ajoutés et le culot a été vigoureusement mélangé. Une fois le culot resuspendu, 10 ml d'une solution de lyse (200mM NaOH, 1% SDS) ont été ajoutés et le mélange a été inversé doucement six fois. La solution a été incubée sur glace pendant 5 min puis 10 ml de solution de neutralisation (3.0 M acétate de potassium, pH 5.5) ont été ajoutés. La solution a été mélangée à nouveau par six inversions et incubée sur glace pendant 20 min.

La solution a été centrifugée à 20 000 g à 4°C pendant 30 min afin d'isoler le surnageant par décantation et par filtration utilisant un papier filtre de grade 1 aux pores de 11µm.

La purification de l'ADN plasmidique s'est effectuée utilisant la trousse « Midi Prep » de la compagnie Qiagen. D'abord, la colonne a été équilibrée (fournie par Qiagen) par l'ajout de 4 ml du tampon équilibrant (solution QBT fournie par Qiagen; 750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton[®] X-100). Après le passage de la solution équilibrante dans la colonne, le surnageant a été ajouté à la colonne. Lorsque le surnageant s'est complètement écoulé, 10 ml de solution de lavage ont été ajoutés à deux reprises dans la colonne (solution QC fournie par Qiagen; 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol). Finalement, lorsque les deux ajouts de solution de lavage ont traversé la colonne, 5 ml de solution d'élution ont été ajoutés à la colonne (solution QF fournie par Qiagen; 1.25 M NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 8.5, 15 % isopropanol).

Pour la précipitation de l'ADN, 7 ml d'isopropanol ont été ajoutés et le tube a été centrifugé à 15 000 g à 4°C pendant 30 min. Le surnageant a ensuite été jeté et le culot d'ADN a été séché puis resuspendu dans 400 µl de TE.

Un lavage au phénol-chloroforme a été effectué puis l'ADN a été précipité dans de l'éthanol et 0.3 M NaCl.

2.1.10 Confirmation de la présence du fragment dans le plasmide.

Afin de confirmer la présence du fragment désiré dans le plasmide, une digestion et/ou un séquençage ont été effectués de nouveau sur le plasmide. Méthode décrite à la section 2.1.8.

2.2 Culture des différentes lignées cellulaires CV-1, PGR, TM4.

Les cellules de fibroblaste de singe vert (CV-1) ont été cultivées dans un milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) enrichi de 10% sérum de veau nouveau-né. Les cellules de la crête génitale du porc (PGR) ont été cultivées dans un milieu DMEM enrichi de 10% de sérum fœtal bovin. Les cellules de Sertoli de souris (TM4) ont été cultivées dans un mélange 1 :1 des milieux DMEM et Ham's F12 contenant 15mM d'HEPES, le tout enrichi de 5% de sérum de cheval et de 2.5% de sérum fœtal bovin. Les 3 types cellulaires ont été cultivés à 37°C et 5% CO₂.

2.3 Transfections des constructions plasmidiques dans les cellules.

Le processus de transfection s'est étalé sur 4 jours. Pour la première étape, les cellules ont été étalées dans des plaques de 24 puits en nombre égal de cellules dans chacun des puits. $2,2 \times 10^4$ cellules pour les lignées CV-1 et TM4, $5,0 \times 10^4$ pour la lignée PGR. Ces cellules ont été déposées dans 0.5 ml de leur milieu de croissance habituel.

Les différents mélanges d'ADN de rapporteur, d'effecteurs, de plasmides contrôles et 25 µl de phosphate de calcium [2M] ont été préparés dans des tubes de 1.5 ml. Ces mélanges contenaient 2 µg du plasmide rapporteur contenant le fragment de promoteur *SRY* humain ou porcin, les plasmides effecteurs à leur dose optimale ainsi qu'une quantité de plasmide d'expression (pCT) vide afin d'avoir une quantité de plasmide effecteur constante

de 0.75 µg et finalement, 1.25 µg de plasmide SP64 (Promega, Madison, WI) afin d'avoir une quantité totale d'ADN de 4 µg par duplicata.

Deux méthodes de transfection au phosphate de calcium ont été utilisées et ont montré des résultats identiques. La première consiste à déposer 50 µl de 2X-HBS pH 7.05 (10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄-2H₂O, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES) dans des tubes de 10mm, d'ajouter dans le fond du tube, à l'aide d'une pipette, le mélange d'ADN et de CaCl₂ puis ensuite former des bulles d'air en soufflant à l'aide du piston de la pipette. Ceci permet le mélange de l'ADN, du CaCl₂ et du HBS afin de former des cristaux d'ADN et de calcium permettant la pénétration des cellules.

La deuxième méthode, consiste à ajouter le mélange d'ADN et de CaCl₂ goutte par goutte dans le HBS pendant que ce dernier est mélangé à l'aide d'un agitateur de type « vortex » à faible intensité.

Dans les deux cas, une période d'incubation de 30 min à température ambiante a précédé le dépôt du mélange d'ADN, CaCl₂ et HBS sur les cellules.

De 12 à 16 heures après la transfection, les cellules ont été rincées de leur milieu contenant les cristaux d'ADN puis 0.5 ml de milieu DMEM-10%NCS frais a été ajouté. Pour 24 heures, les cellules ont ensuite été incubées à 37°C avec 5% CO₂, ce qui leur a permis de produire la protéine luciférase sous le contrôle du promoteur étudié.

Finalement, 48 heures après la transfection, le milieu a été retiré des puits et les cellules ont été lysées en présence de 50 µl d'un tampon de lyse [0.1 M de tris-HCl, 0.005 M de dithiothreitol (DTT) et 0.5% de IGEPAL (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO)]. Le temps d'incubation de la lyse cellulaire a été de 15 min, après quoi, les lysats ont été transférés dans des tubes à essai pour les mesures de l'activité luciférase qui ont été prises à l'aide du luminomètre LB9507 EG&G Berthold (Bad Wildbad, Germany).

Les activités luciférase basales ont été comparées avec celles où le promoteur a été stimulé par l'ajout de facteur de transcription afin de connaître le degré d'activation du promoteur par cet effecteur.

Les résultats obtenus représentent une moyenne d'au moins trois expériences dont chacune a été effectuée en duplicata.

2.4 Mutagenèse dirigée des sites GATA sur le promoteur porcin.

2.4.1 Polymérisation en chaînes.

Afin de déterminer l'importance relative de chaque élément GATA se trouvant sur le promoteur *SRY* de porc, il a été nécessaire d'inactiver chacun des sites et de comparer ainsi les différents promoteurs mutants. Les différents sites GATA ainsi que leur position sont démontrés dans la figure 2.1.

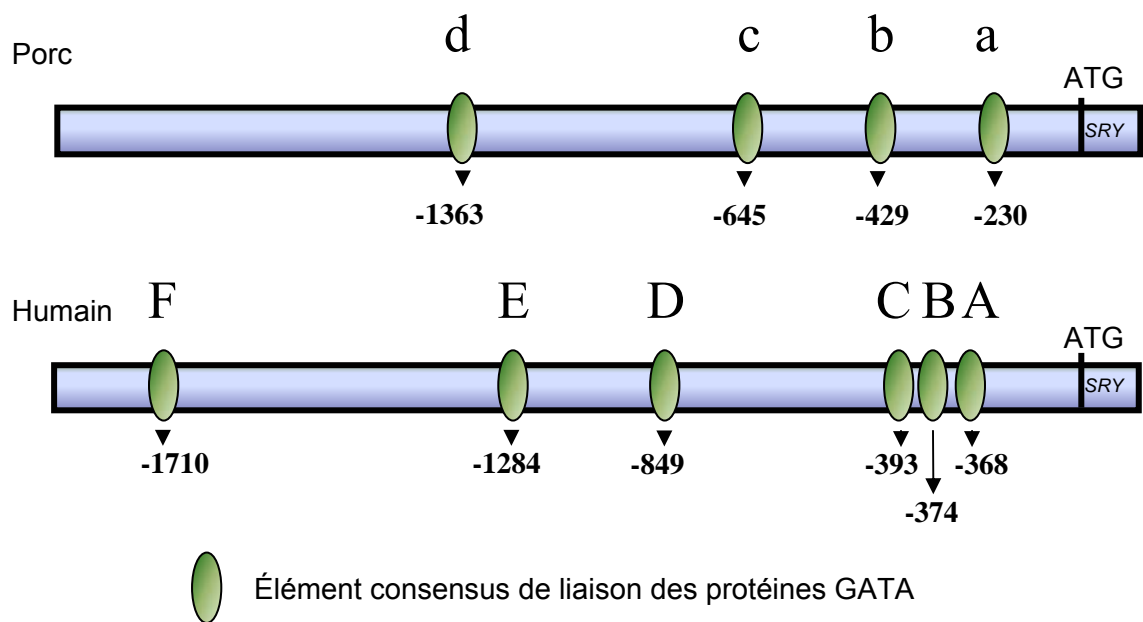


Figure 2.1 Positions des différents sites GATA étudiés sur les promoteurs *SRY* du porc et de l'humain. Une lettre est désignée pour chaque site GATA. Les lettres sont en majuscule pour le promoteur *SRY* humain et en minuscule pour celui du porc.

Des amorces ont été produites pour la mutagenèse par PCR des sites GATA du promoteur porcin. Une substitution d'un seul nucléotide est nécessaire pour l'inactivation d'un site GATA; il suffit de changer la séquence GATA en GGTA.

Les oligos ont été sélectionnés à l'aide de la formule pour déterminer la température de fusion et des critères mentionnés dans le protocole QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) et leurs séquences sont représentées dans le tableau 2.3.

Site GATA muté	Orientation	Séquences
a	Sens	5'-GAA CAG AAA GCA AGC CTT <u>ATT ACC ATA</u> ATA AGT AAG CAG TTT TGC-3'
	Antisens	5'-GCA AAA CTG CTT ACT TAT TAT <u>GGT AAT</u> AAG GCT TGC TTT CTG TTC-3'
b	Sens	5'-CGA AAG GAA AGG AAT TGG <u>GTT ACC TTG</u> AAT CTC TGT GTT AAA C-3'
	Antisens	5'-GTT TAA CAC AGA GAT TCA <u>AGG TAA CCC</u> AAT TCC TTT CCT TTC G-3'
c	Sens	5'-GCT AGT ATA TAT TAA CAT ACT <u>GGT AAT</u> CAT CAG CAG AGG TAT TCA C-3'
	Antisens	5'-GTG AAT ACC TCT GCT GAT GAT <u>TAC CAG</u> TAT GTT AAT ATA TAC TAG C-3'
d	Sens	5'-CCT TTG AGT TCC AAG <u>GTT ACC TGT TTT</u> TCT CTT AAT GGA ACC-3'
	Antisens	5'-GGT TCC ATT AAG AGA AAA ACA <u>GGT AAC</u> CTT GGA ACT CAA AGG-3'

Tableau 2.3 Oligos contenant les sites GATA a, b, c ou d du promoteur SRY de porc utilisés la mutagénèse de ces sites. Les sites GATA sont identifiés par des lettres minuscules dont la légende est représentée à la figure 2.1. Les sites GATA sont soulignés sur les séquences et les mutations sont en caractères gras.

Pour les réactions de polymérisation en chaîne, les mélanges contenaient 5 µl de tampon 10X (fourni avec la trousse, Stratagene), 10 ng du plasmide à muter, 10 pmol de chacun des oligonucléotides servant d'amorce, 1 µl de mélange de dNTP [10mM], 3 µl de la solution (QuikSolution) (fournie avec la trousse, Stratagene), 1 µl de la polymérase d'ADN *PfuTurbo* (fournie avec la trousse, Stratagene) dans un volume total de 50 µl ajusté avec de l'eau. Afin d'éliminer l'évaporation de la solution, le mélange a été recouvert d'une couche d'huile minérale.

La polymérisation en chaîne a eu lieu dans une machine Eppendorf (master cycler gradient, Hamburg) suivant le cycle suivant :

Étape	Température	Temps
	°C	min;sec
1 - Dénaturation	95	1;0
2 - Dénaturation	95	0;50
3 - Appariement	60	0;50
4 - Élongation	68	2;0 / kb plasmide
5 - Répétition du cycle	Retour à l'étape 2 (17 fois)	
6 - Élongation finale	68	7;0
7	22	Maintenir

Tableau 2.4 Cycle PCR de la mutagenèse dirigée des différents site GATA se trouvant sur le promoteur *SRY* du porc.

2.4.2 Digestion des plasmides parentaux.

Suite à l'amplification des plasmides à l'aide d'amorces contenant les mutations inactivant les sites GATA consensus, on retrouve les plasmides mutés dans les mélanges, mais aussi les plasmides parentaux. Afin de s'assurer d'amplifier les plasmides mutés, les plasmides parentaux ont été éliminés par digestion du mélange avec l'enzyme de restriction *DpnI* qui coupe l'ADN seulement lorsque son site est méthylé. Dans le cas présent, seul les plasmides parentaux étaient méthylés car ils provenaient d'une amplification par bactéries.

Pour la digestion par *DpnI*, 1 μ l de l'enzyme de restriction a été ajouté sous la couche d'huile minérale et le mélange a été incubé pendant une heure à 37°C

2.4.3 Transformation

Les cellules ultra compétentes XL10-Gold ont été dégelées délicatement sur glace et aliquotées en 45 μ l par tube. 2 μ l de β -mercaptoéthanol (β -ME) ont été ajoutés et le mélange a été incubé sur glace pendant 10 min. Ensuite, 2 μ l de la réaction PCR ont été ajoutés aux cellules et le mélange a été à nouveau incubé sur glace pendant 30 min. Le traitement choc à la chaleur a été effectué à 42°C durant 30 secondes et il a été suivi de l'ajout de 0.5 ml de milieu LB. Suite à une incubation d'une heure à 37°C, le mélange a été étalé sur pétri de milieu LB-agar contenant 100ug/ml de l'antibiotique ampicilline. Des colonies de grosseur appréciable ont été obtenues suite à une incubation des pétris à 37°C pendant 16 heures.

Une dizaine de colonies ont ensuite été amplifiées afin d'isoler leur plasmide et de vérifier si les bactéries contenaient le plasmide muté. Pour vérifier l'authenticité du plasmide, une digestion a été effectuée pour détecter la présence d'un insertion dans le plasmide puis un séquençage a été effectué afin de confirmer la mutation. Ces techniques ont été décrites au point 2.1.8.

Lorsqu'un clone a été identifié pour contenir le plasmide désiré, une amplification de plasmide a été effectuée afin d'obtenir de grandes quantités du plasmide pour des expériences de transfection transitoire. La technique d'amplification de plasmide a été décrite au point 2.1.9.

2.5 Retardement sur gel

2.5.1 Production de protéines GATA-4 à partir de la trousse TnT.

La protéine GATA-4 recombinante a été produite à l'aide de la trousse « TnT (Transcription and Translation) Coupled Reticulocyte Lysate Systems » suivant le protocole de la compagnie Promega (Madison, WI). 12.5 µl de lysat de réticulocytes de lapin (fourni avec la trousse Promega) ont été mélangés à 1 µl de tampon TnT (fourni avec la trousse Promega), 0.5 µl de solution d'acides aminés sans leucine, 0.5 µl de solution d'acides aminés sans méthionine, 1.0 µg du plasmide d'expression codant pour la protéine GATA-4, 1.0 µl de l'enzyme RNasin (qui inhibe l'action de la RNase) et 0.5 µl de l'ARN polymérase T7. La génération de la protéine a eu lieu à 30°C pendant 2 heures. La protéine a ensuite été conservée à -80°C.

2.5.2 Préparation de sondes radioactives et sondes froides

Différents oligonucléotides ont été utilisés pour l'analyse de liaison entre la protéine GATA-4 et les éléments GATA retrouvés sur le promoteur *SRY* porcin. Les différentes séquences des oligonucléotides sont représentées au tableau 2.5.

Pour l'étude de la liaison coopérative entre GATA-4 et le promoteur *SRY* porcin, des oligonucléotides ont été construits de sorte qu'ils contiennent les quatre éléments GATA proximaux (**a-b-c-d**) du promoteur *SRY* porcin. Certains oligonucléotides présentent les sites GATA sauvages tandis que d'autres ont des mutations inhibant la liaison de la protéine GATA. Les séquences des différentes amorces utilisées pour cette expérience sont représentées au tableau 2.6.

Le marquage de sonde par phosphorylation à l'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ consiste à marquer un oligonucléotide à son extrémité 5' puis à l'apparier à un oligonucléotide complémentaire. Cinquante ng d'un oligonucléotide ont été mélangés avec 1 µl du tampon kinase 10X (fourni par New England Biolabs), 5 µl d'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ (250 µCi/µl), 1 µl de T4-PNK puis le volume a été ajusté avec de l'eau jusqu'à 10 µl. La solution est incubée à 37°C pendant une

heure. Ensuite, 150 ng du deuxième oligonucléotide, complémentaire à celui marqué, ont été ajoutés avec 1 µl de NaCl (1.5M) et de l'eau pour un volume final de 15 µl. La sonde a été chauffée à 95°C pendant 5 min et refroidie graduellement durant 2 heures.

Site GATA	Sauvage ou muté	Séquences
a	Sauvage	5'-GAT CCG CCT TAT <u>TAT CAT</u> AAT AAA-3' et 5'-GAT CTT TAT TAT <u>GAT AAT</u> AAG GCG-3'
a	Muté	5'-GAT CCG CCT TAT <u>TAC CAT</u> AAT AAA-3' et 5'-GAT CTT TAT TAT <u>GGT AAT</u> AAG GCG-3'
b	Sauvage	5'-GAT CCA TTG GGT <u>TAT CTT</u> GAA TCA-3' et 5'-GAT CTG ATT CAT <u>GAT AAC</u> CCA ATG-3'
c	Sauvage	5'-GAT CCA CAT ACT <u>GAT AAT</u> CAT CAA-3' et 5'-GAT CTT GAT GAT <u>TAT CAG</u> TAT GTG-3'
d	Sauvage	5'-GAT CCC CAA GGT <u>TAT CTG</u> TTT TTA-3' et 5'- GAT CTA AAA ACA <u>GAT AAC</u> CTT GGG-3'

Tableau 2.5 Oligos contenant différents sites GATA du promoteur SRY de porc utilisés lors de retardement sur gel. Les sites GATA sauvages ou possédant une mutation sont identifiés par des lettres minuscules dont la légende est représentée à la figure 2.1. Le site GATA est souligné sur les séquences et la mutation est en caractères gras.

Sites GATA sauvages	Sites GATA mutés	Séquences
a-b-c-d		5'-AAG <u>GTT</u> ATC <u>TGT</u> TTA <u>CTG</u> ATA <u>ATC</u> AGG GTT ATC <u>TTG</u> ATT <u>ATT</u> <u>ATC</u> ATA AT-3' et 5'-ATT ATG ATA <u>ATA</u> ATC <u>AAG</u> ATA <u>ACC</u> CTG ATT ATC <u>AGT</u> AAA <u>CAG</u> <u>ATA</u> <u>ACC</u> TT-3'
b-c-d	a	5'-AAG <u>GTT</u> ATC <u>TGT</u> TTA <u>CTG</u> ATA <u>ATC</u> AGG GTT ATC <u>TTG</u> ATT <u>ATT</u> ACC ATA AT-3' et 5'-ATT ATG GTA ATA ATC <u>AAG</u> ATA <u>ACC</u> CTG ATT ATC <u>AGT</u> AAA <u>CAG</u> <u>ATA</u> <u>ACC</u> TT-3'
	a-b-c-d	5'-AAG <u>GTT</u> ACC <u>TGT</u> TTA <u>CTG</u> GTA <u>ATC</u> AGG GTT ACC <u>TTG</u> ATT <u>ATT</u> ACC ATA AT-3' et 5'-ATT ATG GTA ATA ATC <u>AAG</u> GTA <u>ACC</u> CTG ATT ACC <u>AGT</u> AAA <u>CAG</u> GTA <u>ACC</u> TT-3'
a-b	c-d	5'-AAG <u>GTT</u> ACC <u>TGT</u> TTA <u>CTG</u> GTA <u>ATC</u> AGG GTT ATC <u>TTG</u> ATT <u>ATT</u> ATC ATA AT-3' et 5'-ATT ATG ATA <u>ATA</u> ATC <u>AAG</u> ATA <u>ACC</u> CTG ATT ACC <u>AGT</u> AAA <u>CAG</u> GTA <u>ACC</u> TT-3'
a-b-c	d	5'-AAG <u>GTT</u> ACC <u>TGT</u> TTA <u>CTG</u> ATA <u>ATC</u> AGG GTT ATC <u>TTG</u> ATT <u>ATT</u> ATC <u>ATA</u> AT-3' et 5'-ATT ATG ATA <u>ATA</u> ATC <u>AAG</u> ATA <u>ACC</u> CTG ATT ATC <u>AGT</u> AAA <u>CAG</u> GTA <u>ACC</u> TT-3'

Tableau 2.6 Oligos contenant les sites GATA a-b-c-d du promoteur SRY de porc utilisés lors de retardement sur gel. Les sites GATA sont identifiés par des lettres minuscules dont la légende est représentée à la figure 2.1. Les sites GATA sont soulignés et les mutations sont en caractères gras.

La sonde a été séparée des nucléotides radioactifs non-incorporés par purification sur une colonne de Sephadex G-25 par centrifugation à l'aide de 35 μ l d'une solution de Tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 10mM. L'efficacité du marquage a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillations liquide (Beckmann, LS5000CE).

Les sondes non-marquées compétitrices ont été fabriquées parallèlement en mélangeant 3 μ g de deux oligonucléotides complémentaires avec 1 μ l de NaCl (1.5M) dans un volume final de 15 μ l ajusté avec de l'eau. Les solutions ont été chauffées à 95°C pendant 5 min et refroidies graduellement pendant 2 heures.

2.5.3 Liaison entre la protéine GATA-4 et les éléments GATA.

Pour la liaison de la protéine avec la sonde nucléique, $5,0 \times 10^4$ CPM de sonde radioactive ont été déposés dans chacune des réactions avec 50ng de dIdC (des oligonucléotides composés d'inosine et de cytosine qui agit comme compétiteur de liaison afin de réduire les liaisons non spécifiques), 100ng d'albumine de sérum bovin et 1.5 μ l d'un tampon 5X (1M Tris pH 8, 3M KCl, 1M DTT, 0.5M EDTA, 0.1M $MgCl_2$, 50% glycérol). Ensuite, 7.5 μ l de cette première solution ont été mélangés avec 12.5 μ l d'une solution contenant 0, 2, 5 ou 10 fois la sonde compétitrice froide, 0 ou 5 μ l de protéine GATA-4 et 2.5 μ l du tampon 5X.

La liaison entre la protéine et la sonde a eu lieu lors d'une incubation sur glace d'une durée d'une heure. Le complexe protéine-ADN a été migré à 200 volts dans un gel d'acrylamide 13.4% (6.7 ml Acrylamide : Bis-Acrylamide 30 : 1.2, 5 ml TBE 5X (Tris Acide Borique EDTA), 38 ml H₂O, 320 μ l APS 10%, 50 μ l Temed) baignant dans un tampon de migration de TBE 0.5X. La migration a eu lieu à 4°C pendant deux heures.

Le gel a ensuite été transféré sur un papier whatman puis a été séché utilisant un sècheur à gel BioRad (modèle 583) et une pompe BioRad (HydroTech vacuum Pump). Un film kodak (Biomax MS) a été exposé au gel séché sur membrane et le signal a été amplifié par un écran réflecteur à -80°C durant une période de 2 à 16 heures dépendamment de l'intensité de la radioactivité. Le film a ensuite été révélé à l'aide d'un développeur pour autoradiographie (AFP Imaging Corp. Minimed/90).

Chapitre III : Résultats

3.1 Caractérisation des promoteurs *SRY* humain, porc et de souris.

On retrouve dans la littérature, les séquences promotrices des gènes *SRY* de l'humain, du porc et de la souris. L'analyse des séquences 5' non transcrites des gènes *SRY* a révélé plusieurs sites GATA consensus (A/T)GATA(A/G) sur les séquences de porc, d'humain et de souris (voir figure 3.1). Par rapport à l'ATG, les sept sites GATA retrouvés sur les 5kb flanquant en 5' du gène *SRY* porc sont placés à -230pb, -429pb, -645pb, -1363pb, -3598pb, -3887pb et -4515pb de l'ATG. Vingt et un sites répondant à la séquence consensus WGATAR ont été répertoriés dans la région de 8kb en amont de l'ATG du gène *Sry* de souris dont les positions relatives à l'ATG sont -612pb, -628pb, -1063pb, -1308pb, -1312pb, -1893pb, -2622pb, -3213pb, -3465pb, -3946pb, -4632pb, -4897pb, -5225pb, -5323pb, -5373pb, -5730pb, -6336pb, -6416pb, -6850pb, -7478pb et -7967pb de l'ATG. Finalement, en se référant à la position de l'ATG, les onze sites GATA du promoteur *SRY* humain se trouvent à -368, -374pb, -393pb, -849pb, -1284pb, -1710pb, -1939pb, -1962pb, -2852pb, -4052pb et -4551pb.

Divers articles mentionnent la présence d'éléments de liaison potentiels pour la protéine WT1 sur les promoteurs *SRY*. Un seul a été observé sur le promoteur *SRY* humain à -30 pb du codon initiateur (112). Cet élément WT1 est reconnu par la protéine WT1 et sa présence est essentielle pour la pleine activation du promoteur. En comparant les séquences des promoteurs *SRY* humain, porc et murin avec les différentes séquences reconnues par la protéine WT1 (140-143), quelques éléments WT1 (WTE) potentiels ont été détectés. Six WTE potentiels ont été trouvés sur les 1400 pb en amont de l'ATG du gène *SRY* du porc. Les positions relatives à l'ATG des WTE sont : -15 pb, -472 pb, -598 pb, -1164 pb et -1215 pb. Il y a deux WTE qui se chevauchent à la position -1164 pb. Deux WTE ont été détectés sur le promoteur *Sry* murin aux positions -50 pb et -940 pb de l'ATG.

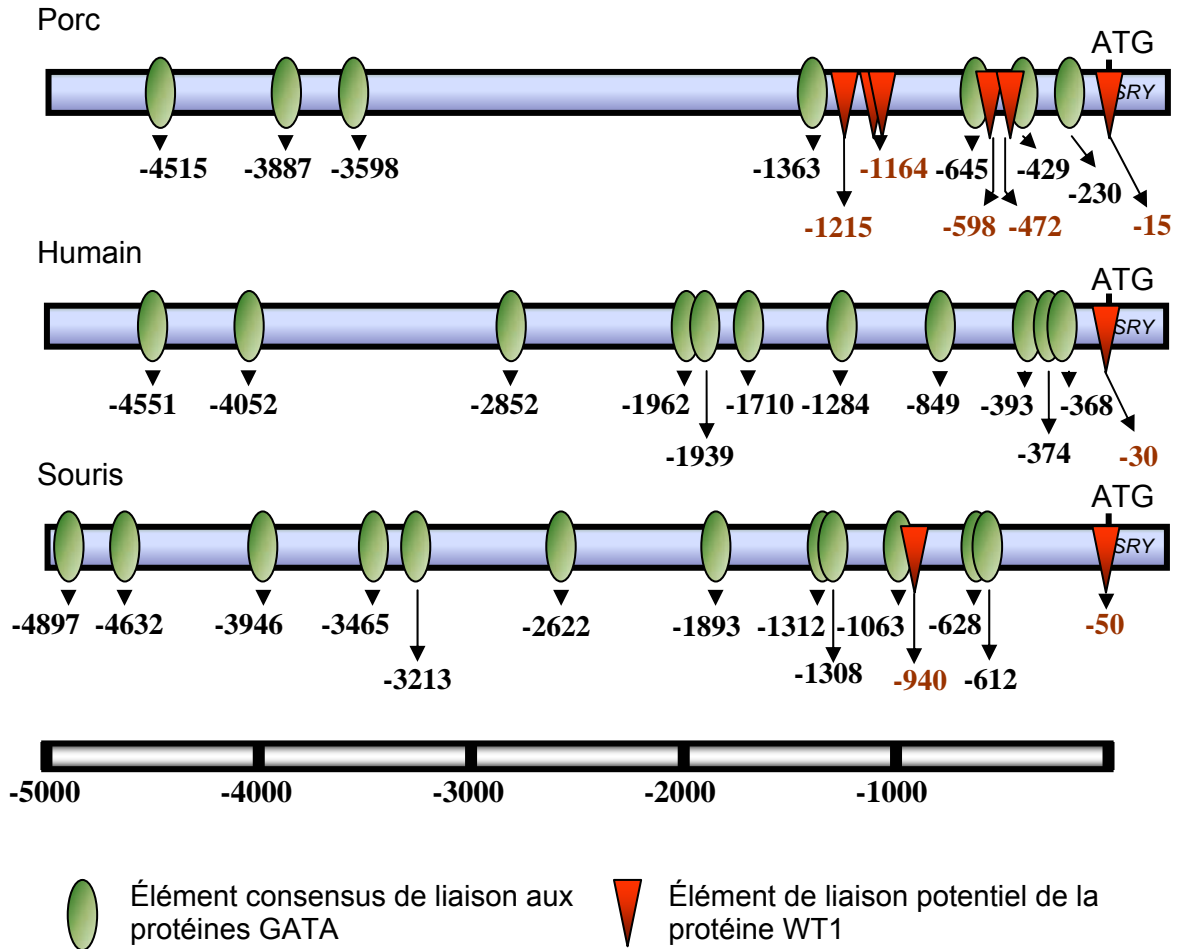


Figure 3.1 Distribution des éléments GATA consensus ainsi que des éléments de liaison potentiels WT1 sur les promoteurs *SRY* du porc, de l'humain et de la souris. Les positions sont relatives aux codons initiateurs ATG de chacun des gènes.

3.2 Clonage de délétions de la région 5' régulatrice du gène *SRY* humain et porcin.

La génération des délétions des promoteurs *SRY* a été suffisamment concluante pour mener à bien la suite des expériences. Les digestions et les séquençages ont montré que les fragments de 223 pb, 347 pb, 508 pb, 730 pb et 1375 pb du promoteur *SRY* porcin et les fragments de 230 pb, 237 pb, 243 pb, 331 pb, 744 pb, 1242 pb et 1605 pb du promoteur *SRY* humain ont été insérés avec succès dans le vecteur rapporteur. Les sous-clonages de

fragments de longueurs supérieures à 1605 pb n'ont pas été produits avec succès, mais ceux qui ont été accomplis sont suffisamment longs pour l'étude présente. En effet, pour l'activation du promoteur *SRY* du porc, une étude a démontré que le fragment de -1400 pb en amont de l'ATG avait une activité basale aussi intense qu'une construction contenant les 4500 pb en amont de l'ATG dans des cellules de la crête urogénitale (71). La construction la plus longue pour le promoteur *SRY* humain obtenue au cours de la précédente étude atteint 1605 pb; cela est donc suffisant pour établir le niveau de conservation du mécanisme de régulation transcriptionnelle des promoteurs *SRY* humain et porc.

3.3 Rôle de GATA-4 dans la régulation transcriptionnelle du promoteur *SRY* humain et porc.

Afin d'évaluer l'activation par GATA-4 des différentes constructions de promoteur *SRY* humain et porc, des transfections transitoires au phosphate de calcium dans les cellules hétérologues CV-1 ont été effectuées. Les cellules CV-1 n'expriment ni *SRY* ni GATA-4, ce qui en font un modèle efficace pour déterminer l'effet de l'ajout de la protéine GATA-4 sur les promoteurs *SRY*. Les résultats montrent une activation du promoteur *SRY* porc par le facteur de transcription GATA-4 (voir figure 3.2). Suite à la transfection du plasmide d'expression GATA-4 (5 ng/puits), l'activité du promoteur *SRY* porc est augmentée de 5 à 10 fois avec les constructions contenant un ou deux éléments GATA. La plus haute augmentation d'activité promotrice par GATA-4 est enregistrée avec la portion de promoteur contenant trois éléments GATA et cette augmentation se chiffre aux alentours de 20 fois.

La même étude a été effectuée avec différentes constructions du promoteur *SRY* humain. La pouvoir d'activation transcriptionnelle de GATA-4 que l'on retrouve avec le promoteur porc n'est toutefois pas observé dans le contexte du promoteur *SRY* humain. Aucune transactivation significative par GATA-4 n'a été mesurée avec les fragments de promoteur *SRY* humain entre 230 et 1600 pb (voir figure 3.3). Par contre, la construction de 1605 pb, contenant six sites de liaisons pour les protéines GATA, est activée environ deux

fois en présence de la protéine GATA-4. Néanmoins, il est clair que le promoteur *SRY* humain ne se comporte pas comme celui du porc en présence de GATA-4.

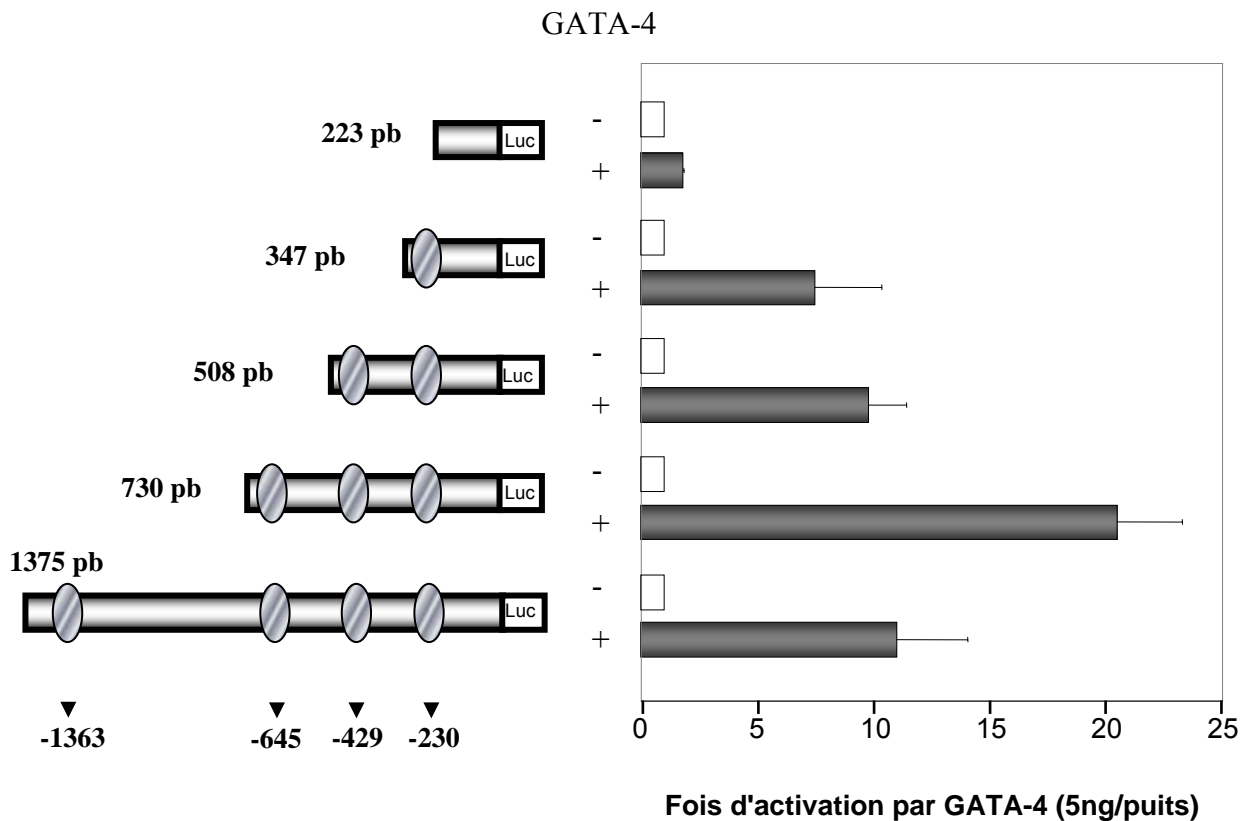


Figure 3.2 Transactivation du promoteur *Sry* porcin par la protéine GATA-4 dans les cellules CV-1. Des transfections transitoires au phosphate de calcium ont été effectuées sur des cellules hétérologues CV-1 avec les constructions du promoteur *SRY* porcin de 223pb, 347pb, 508pb, 730pb et 1375pb en présence de vecteur d'expression vide ou exprimant GATA-4 (5 ng/puit). Pour chaque construction promotrice utilisée, les barres foncées montrent la fois d'activation du promoteur en présence de GATA-4. Les barres blanches représentent les activités promotrices en absence de GATA-4. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences effectuées en duplicata.

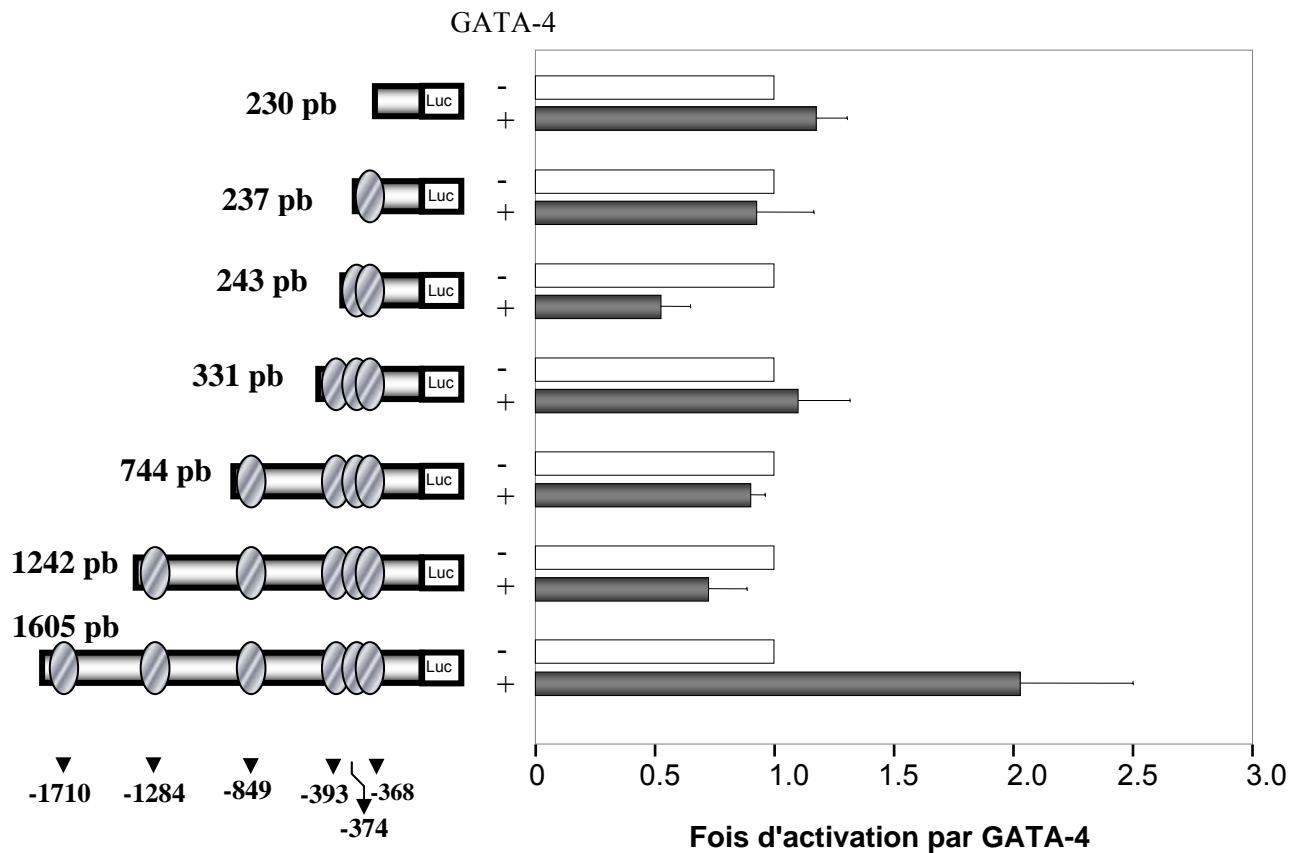


Figure 3.3 Transactivation de constructions du promoteur *SRY* humain par la protéine GATA-4 dans les cellules CV-1. Des transfections transitoires au phosphate de calcium ont été effectuées sur des cellules hétérologues CV-1 avec les constructions du promoteur *SRY* humain de 230pb, 237pb, 243pb, 331pb, 744pb, 1242pb et 1605pb en présence de vecteur d'expression vide ou exprimant GATA-4 (5 ng/puit). Pour chaque construction promotrice utilisée, les barres foncées montrent la fois d'activation du promoteur en présence de GATA-4. Les barres blanches représentent les activités promotrices en absence de GATA-4. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences effectuées en duplicata.

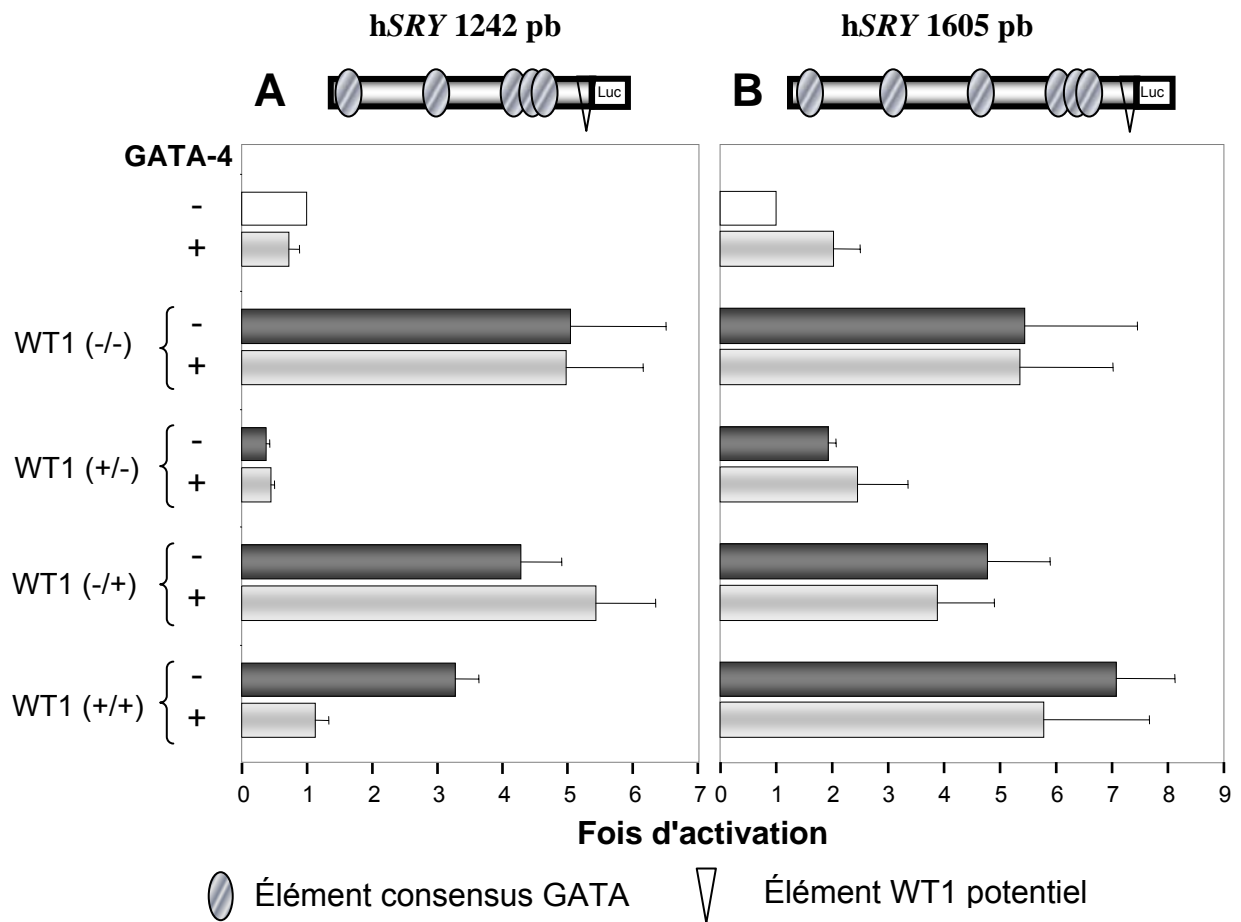


Figure 3.4 Transactivation de la délétion du promoteur SRY humain de longueur de 1242 pb (A) et 1605 pb (B) par les isoformes de WT1 et GATA-4 dans cellules CV-1. Des transfections transitoires au phosphate de calcium ont été effectuées sur des cellules hétérologues CV-1 avec les constructions du promoteur SRY humain de 1242pb et 1605pb en présence de vecteur d'expression vide ou exprimant l'un des quatre isoformes de WT1 (125ng/puits) (-/-), (-/+), (+/-), (+/+) avec ou sans vecteur exprimant GATA-4 (5 ng/puit). Les barres grises pâles et foncées montrent les fois d'activation du promoteur en présence des effecteurs comparées à l'activité du promoteur sans effecteur (barres blanches). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences effectuées en duplicata.

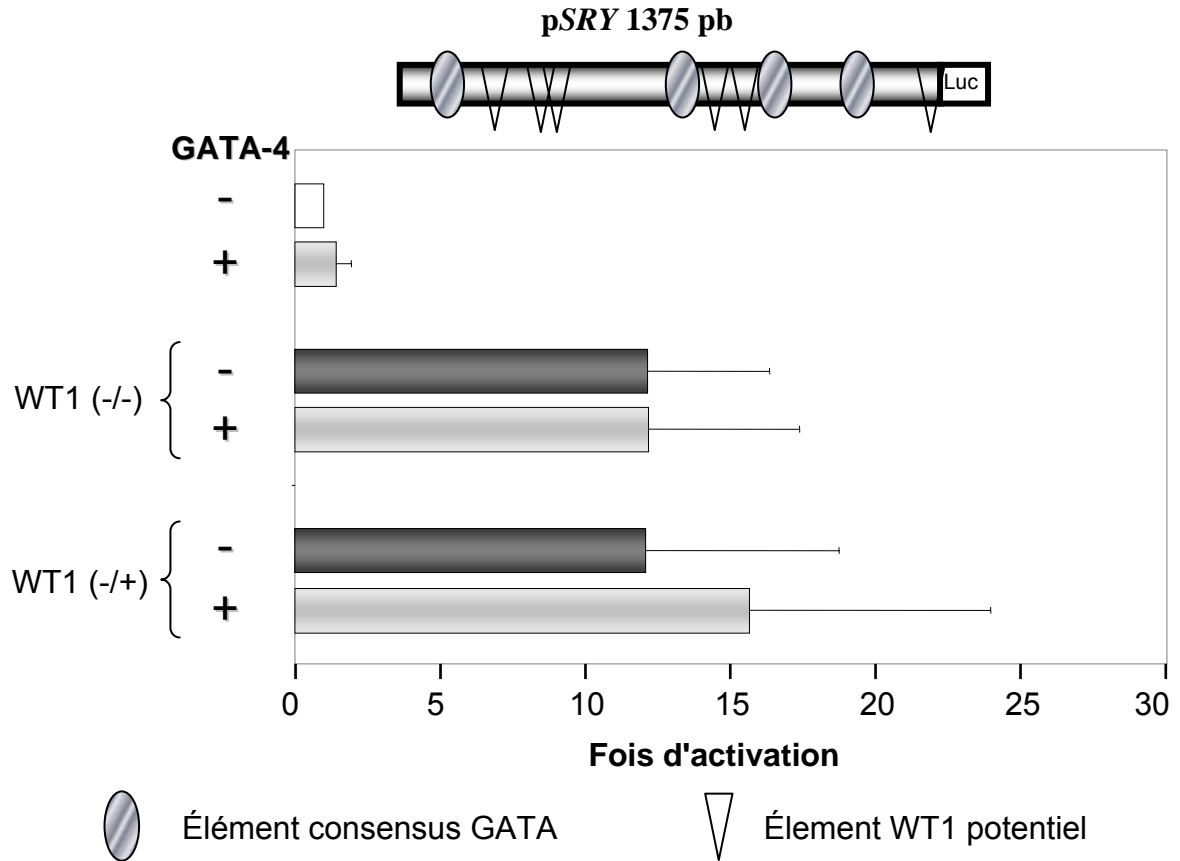


Figure 3.5 Transactivation dans les cellules TM4 du promoteur *SRY* porcin de longueur 1375 pb par les isoformes (+/- KTS) de WT1 et par GATA-4. Des transfections transitoires au phosphate de calcium ont été effectuées sur des cellules hétérologues CV-1 avec les constructions du promoteur *SRY* porcin de 1375pb en présence de vecteur d'expression vide ou exprimant l'un des isoformes de WT1 (125ng/puits) (-/-), (-/+) avec ou sans vecteur exprimant GATA-4 (5 ng/puit). Les barres grises pâles et foncées montrent les fois d'activation du promoteur en présence des effecteurs comparées à l'activité du promoteur sans effecteur (barres blanches). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences effectuées en duplicata.

3.4 Régulation du promoteur *SRY* humain et porcin par les isoformes de WT1 et par GATA-4.

L'activation du promoteur *SRY* par WT1 est connue (112). La présence de plusieurs éléments GATA consensus sur le promoteur suggère un rôle pour GATA-4 dans l'activation du gène *SRY*. Or, GATA-4 seul ne semble pas suffisant pour la pleine activation du promoteur *SRY*. Son action sur le promoteur *SRY* pourrait avoir lieu via une interaction physique avec WT1 ou une coopération transcriptionnelle.

Afin d'étudier une coopération transcriptionnelle potentielle entre les facteurs de transcription GATA-4 et WT1, des expériences de cotransfections ont été effectuées dans des cellules CV-1. Des plasmides rapporteurs exprimant la luciférase sous le contrôle de portions des promoteurs *SRY* humain et porcin ont été ajoutés à des cellules hétérologues en présence ou en absence des plasmides d'expression codants pour la protéine GATA-4 et WT1. Les expériences de cotransfections n'ont démontré aucune coopération transcriptionnelle entre GATA-4 et WT1 (voir figure 3.4).

Il y a eu effectivement une activation du promoteur via WT1 seul, environ quatre fois, mais à l'ajout de GATA-4, aucune augmentation d'activité promotrice n'a été observée. Le même profil d'activation a été observé sur le promoteur *SRY* porcin. Les isoformes WT1 (+/- KTS) activent le promoteur *SRY* porcin, mais ne coopèrent pas avec GATA-4. Des observations similaires ont été observées dans les cellules TM4 (voir figure 3.5) et CV-1.

3.5 La liaison du facteur de transcription GATA-4 aux éléments GATA du promoteur *SRY* porcin est spécifique.

Afin de démontrer que la protéine GATA-4 peut se lier aux éléments GATA du promoteur porcin, des analyses de retardements sur gel ont été effectuées (voir figure 3.6). La sonde marquée correspond à la séquence du site GATA-a (voir figure 2.1) du promoteur *SRY* du porc. Une bande apparaît à la hauteur attendue pour la protéine GATA-4, lorsque la sonde radioactive est incubée en présence de la protéine GATA-4 recombinante. L'ajout

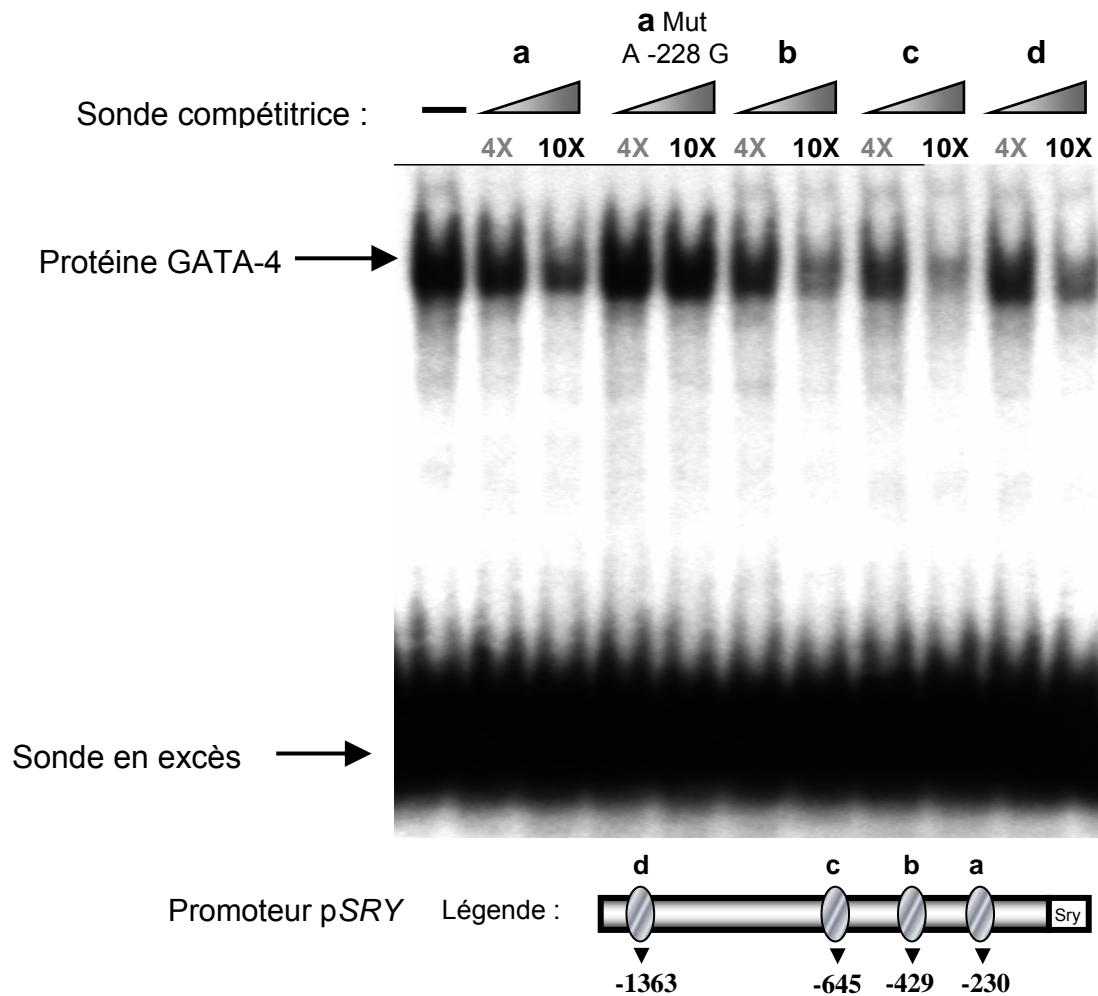


Figure 3.6 Retardement sur gel d'une sonde d'oligonucléotide double brin marquée au ^{32}P contenant le site GATA proximal du promoteur SRY porcin en présence de la protéine recombinante GATA-4 (5 µl). Les compétitions ont été effectuées avec deux doses (4X et 10X) de cinq sondes non marquées représentant les différents sites GATA proximaux (**a**, **b**, **c** ou **d**), sauvage ou muté, présents dans les premiers 1400 pb du promoteur SRY porcin. La mutation effectuée sur le site GATA proximal est une substitution d'un nucléotide GATA en GGTA.

d'une sonde froide compétitrice contenant le site GATA-**a** muté n'a pas déplacé la liaison de GATA-4. Toutefois, la compétition a été très forte lorsqu'une sonde froide contenant n'importe quel site GATA sauvage (**a**, **b**, **c** ou **d**) du promoteur *SRY* porcin est ajoutée à la réaction. Ces observations signifient que la protéine GATA-4 se lie avec haute spécificité sur les quatre éléments GATA qui se retrouvent dans les 1400 pb en amont du gène *SRY* porcin. Cette liaison est spécifique car la liaison a été abolie en présence d'une sonde froide sauvage mais pas en présence d'une sonde où l'élément GATA a été muté en GGTA.

3.6 L'importance des éléments GATA sur le promoteur *SRY* porcin.

Après avoir confirmé que le facteur de transcription GATA-4 pouvait se lier aux différents sites GATA consensus présents sur le promoteur *SRY* porcin, il importait de s'assurer que l'activation du promoteur était médié via la liaison de GATA-4 aux éléments GATA. Des transfections transitoires de différentes constructions de promoteurs *SRY*, où les éléments GATA ont été inactivés alternativement, ont été effectuées dans des cellules homologues PGR, c'est à dire des cellules qui expriment GATA-4 et *SRY*. Les plasmides contenant les fragments de promoteur p*SRY* en amont du gène rapporteur luciférase ont été cotransfectés avec un plasmide rapporteur de *Renilla* Luciférase dont la mesure d'expression a servi à normaliser les activités promotrices des constructions pour corriger l'inefficacité de transfection inhérente à cette méthodologie.

L'inactivation du site GATA-**a** dans le contexte des promoteurs de 508 pb, 730 pb ou 1375 pb a aboli l'activité du promoteur (voir les figures 3.7, 3.8 et 3.9). Dans le contexte du promoteur *SRY* porcin de 508 pb, l'inactivation des sites GATA-**a** et **b** provoque une plus grande diminution d'activité promotrice que l'inactivation du site GATA-**a** seul (voir figure 3.7). Cela suggère que les sites GATA-**a** et **b** contribuent à l'activité du promoteur *SRY* de 508 pb.

Dans le contexte du promoteur *SRY* porcin de 730 pb, l'inactivation du site GATA-**a** ou du site GATA-**b** diminue l'activité du promoteur (voir figure 3.8). Cela indique que le

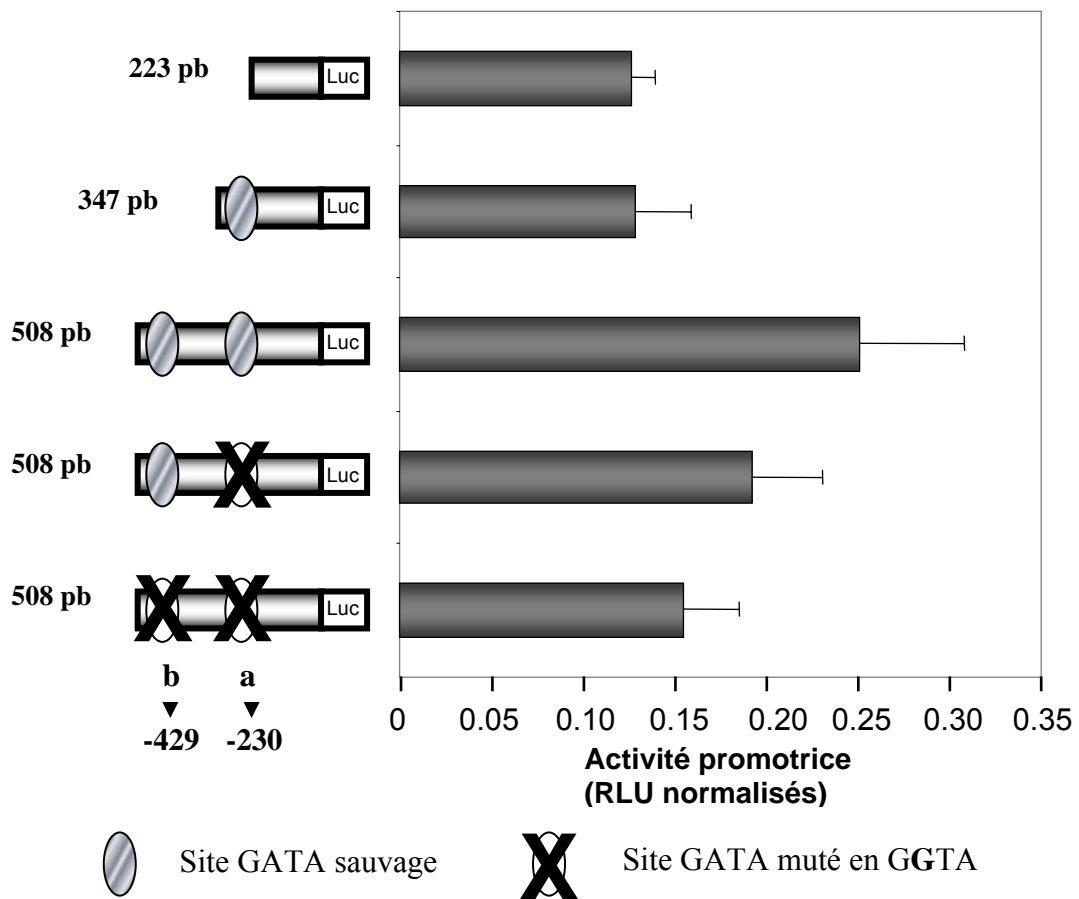


Figure 3.7 Importance des éléments GATA dans l'activation du promoteur *SRY* porcin. Des transfections transitoires de constructions promotrice p*SRY* de longueurs de 223 pb, 347 pb et 508 pb ont été effectuées dans les cellules PGR. Des mutagenèses dirigées ont été effectuées sur la construction de 508 pb afin d'inactiver le site GATA-a proximal ou les deux site GATA-a et b. Les résultats sont présentés en activité promotrice dont la valeur de RLU mesurée a été normalisée à l'aide d'un contrôle interne (plasmide exprimant *Renilla* luciférase sous le contrôle du promoteur HSV-TK). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences effectuées en triplicate.

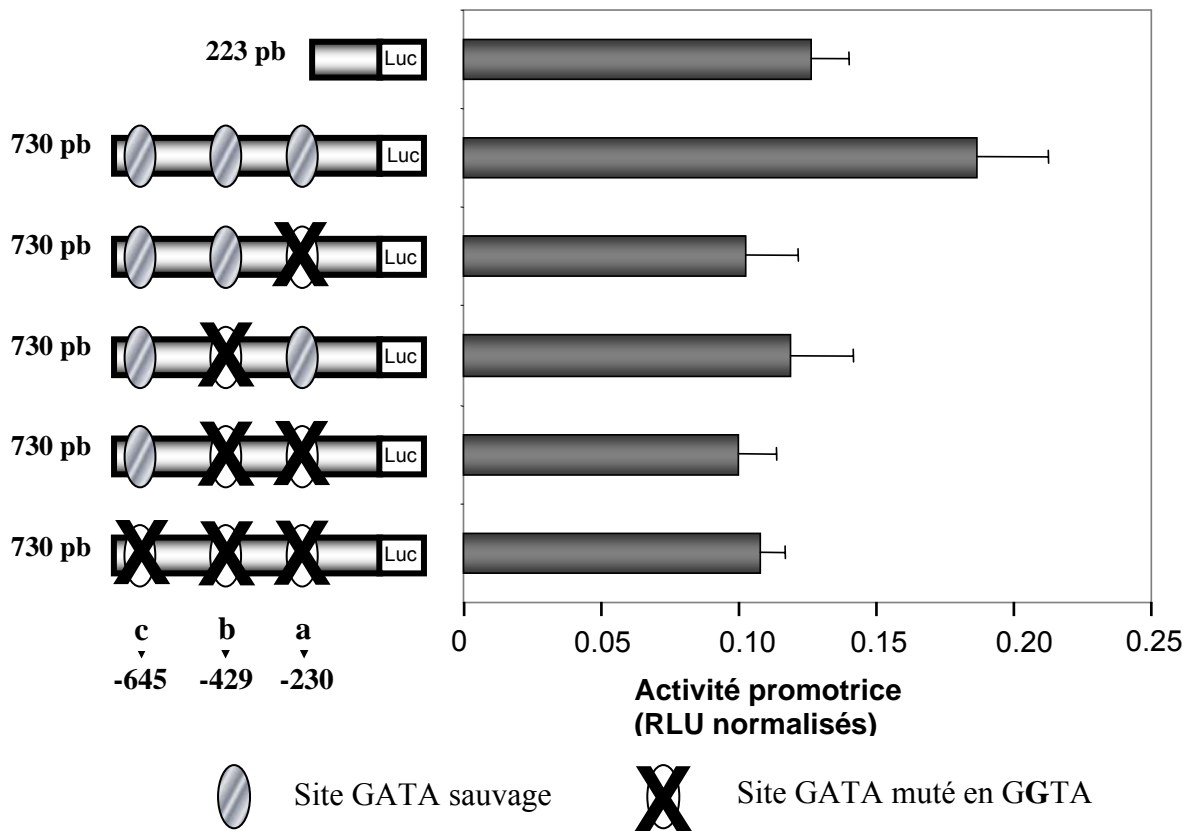


Figure 3.8 Importance des éléments GATA dans l'activation du promoteur *SRY* porcin. Des transfections transitoires de constructions promotrice p*SRY* de longueurs de 223 pb et 730 pb ont été effectuées dans les cellules PGR. Des mutagenèses dirigées ont été effectuées sur la construction de 730 pb afin d'inactiver le site GATA-**a**, le site GATA-**b**, les deux sites GATA-**a** et **b** ou les trois sites GATA-**a**, **b** et **c**. Les résultats sont présentés en activité promotrice dont la valeur de RLU mesurée a été normalisée à l'aide d'un contrôle interne (plasmide exprimant *Renilla* luciférase sous le contrôle du promoteur HSV-TK). Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences effectuées en triplicata.

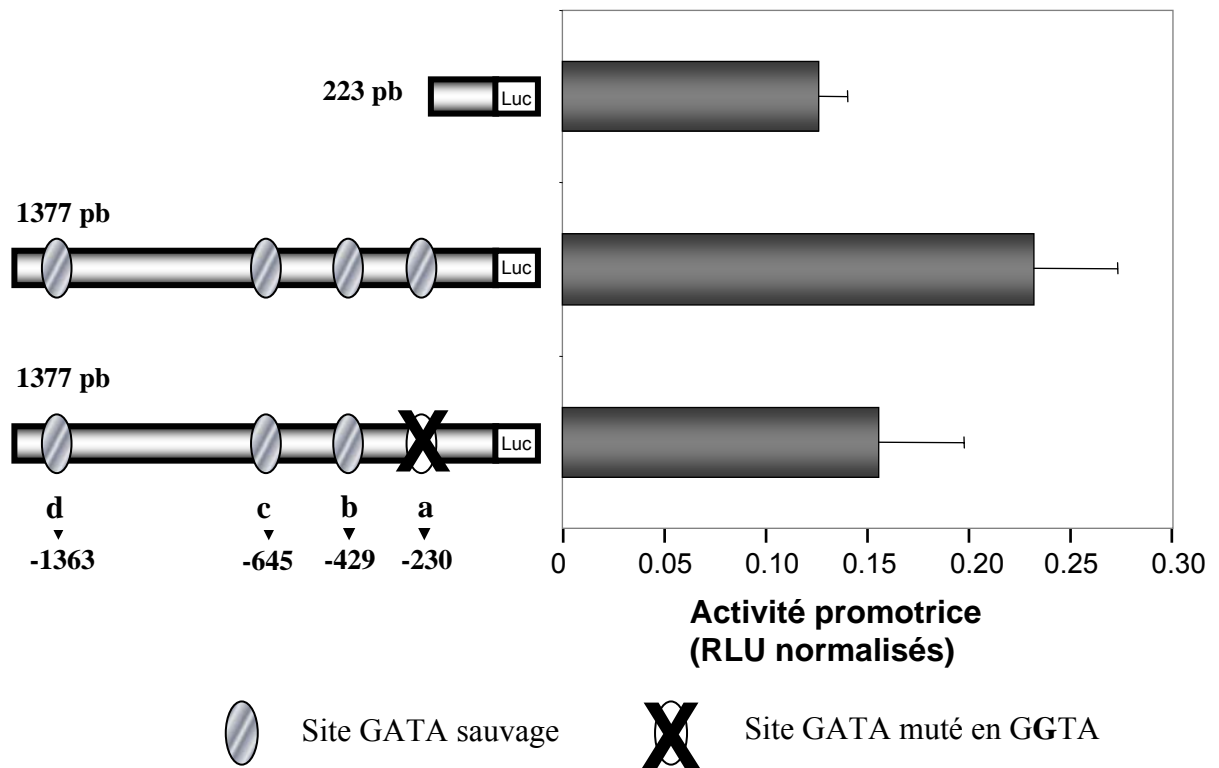


Figure 3. 9 Importance des éléments GATA dans l'activation du promoteur SRY porcin. Des transfections transitoires de constructions promotrice pSRY de longueurs de 223 pb, et 1375 pb ont été effectuées dans les cellules PGR. Une mutagenèse dirigée a été effectuée sur la construction de 1375 pb afin d'inactiver le site GATA-a. Les résultats sont présentés en activité promotrice dont la valeur de RLU mesurée a été normalisée à l'aide d'un contrôle interne (plasmide exprimant *Renilla luciferase* sous le contrôle du promoteur HSV-TK). Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences effectuées en triplicata.

site GATA-**c** n'est pas suffisant à lui seul pour activer le promoteur *SRY* porcin de 730 pb et que les sites GATA-**a** et **b** sont essentiels pour l'activité maximale de ce promoteur.

Afin de vérifier davantage la nécessité du site GATA-**a** dans l'activité du promoteur *SRY* porcin, des transfections ont aussi été faites dans le contexte du promoteur de 1377 pb. Lorsque le site GATA-**a** est inactivé dans le contexte du promoteur de 1377 pb, l'activité du promoteur en est réduit (voir figure 3.9). En effet, l'activité du promoteur de 1377 pb muté sur le site GATA-**a** est similaire à celle du promoteur de 223 pb, qui ne contient aucun site GATA.

3.7 La liaison coopérative de GATA-4 au promoteur *SRY* porcin.

Dans un contexte hétérologue (cellules CV-1), la plus grande activation du promoteur *pSRY* par le facteur de transcription GATA-4 a été observés sur le fragment contenant les 730 pb en amont du gène *pSRY*, soit en présence des trois sites GATA proximaux **a**, **b** et **c** (voir figure 3.2). En comparaison, l'activation par GATA-4 du promoteur *pSRY* ne contenant que le site GATA-**a** était la plus faible. Suite à l'inactivation du site GATA-**a** des promoteurs *pSRY* de 508 pb, 730 pb et 1375 pb, une réduction de l'activité du promoteur a été observée (voir figure 3.7, 3.8 et 3.9). Dans les cellules homologues PGR, l'activité promotrice des ces constructions mutantes est similaire au promoteur *pSRY* minimal de 223 pb. Cela suggère un phénomène de liaison coopérative entre les protéines GATA-4 au sein du promoteur *pSRY*.

Pour tester cette hypothèse, des études de retardement sur gel utilisant un oligo contenant les quatre sites GATA **a**, **b**, **c** et **d** en tandem ont été effectuées (voir figure 3.10). Que ce soit en présence d'un ou de cinq microlitres de protéine recombinante GATA-4, la protéine GATA-4 se lie mieux à la sonde où les quatre sites GATA sont intacts comparé à la sonde où le site GATA-**a** est inactivé. Cela pourrait être dû au fait qu'il y a un site de moins où la protéine peut se lier sur la sonde. Si tel était le cas, l'inactivation d'un quart des sites devrait diminuer l'intensité de la liaison d'un quart aussi. Toutefois, la diminution

observée était plus dramatique (voir figure 3.10). L'intensité des bandes représentant la liaison de GATA-4 aux sondes a été mesurée et leurs densités intégrées ont été évaluées à l'aide d'un logiciel de photographie. Les valeurs de densité intégrée des bandes représentant la liaison de GATA-4 avec la sonde où le site GATA-**a** était muté se rapprochent davantage à 50% que 75% de la valeur de densité intégrée de la sonde sauvage (voir figure 3.11). Donc, cela suggère une liaison coopérative, car il semble que lorsque GATA-4 se lie au site GATA-**a**, d'autres protéines GATA-4 peuvent se lier plus facilement aux autres sites GATA-**b**, **c** et **d**.

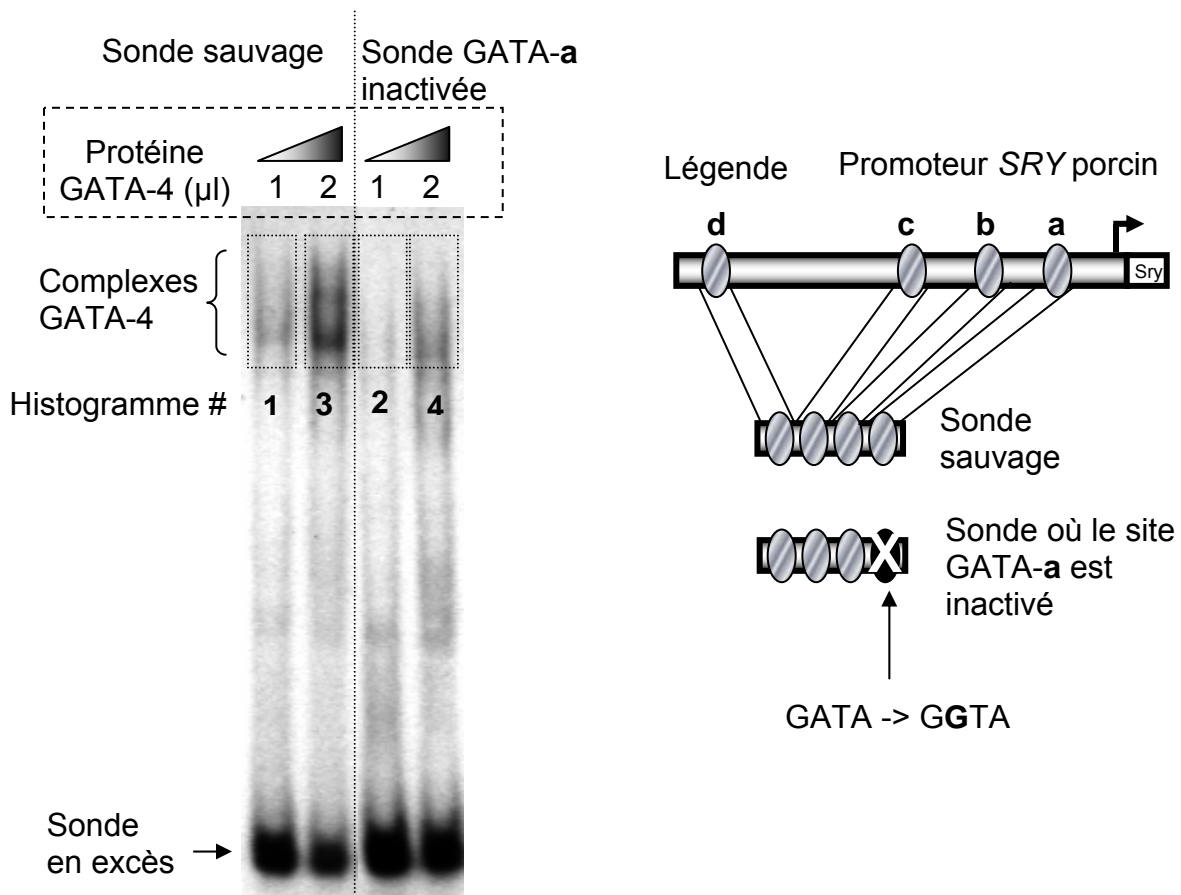


Figure 3.10 Retardement sur gel de sondes d'oligonucléotides double brin marquées au ^{32}P construites à partir des quatre éléments GATA proximaux retrouvés sur le promoteur *SRY* porcine en présence de 1 ou 2 μl de protéine **GATA-4**. Les quatre rectangles pointillés représentent les zones analysées pour le calcul de valeurs de densité intégrée des histogrammes 1, 2, 3 et 4 de la figure 3.11.

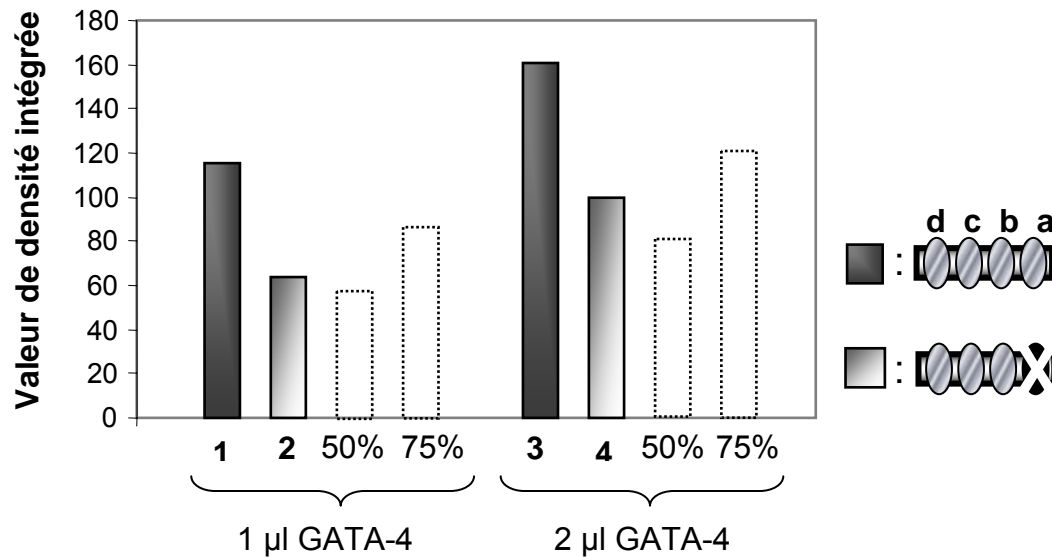


Figure 3.11 Valeurs de densité intégrée des bandes représentant la liaison entre 1 ou 2 µl de protéine recombinante GATA-4 et les sondes radioactives comportants les quatre sites GATA proximaux. Les histogrammes foncés représentent les valeurs de densité intégrée de la sonde où les sites GATA-a, b, c et d sont sauvages et les histogrammes pâles représentent celles de la sonde où le site GATA-a a été muté. Les histogrammes 1, 2, 3 et 4 sont les valeurs de densité intégrée des bandes encadrées et représentées à la figure 3.10. Les histogrammes en pointillés sont des points de repère et représentent les valeurs de 50% et 75% de la densité intégrée de la sonde sauvage.

Chapitre IV: Conclusion

Le mécanisme de la détermination du sexe reste encore un domaine mal compris malgré les nombreuses recherches qui lui sont consacrées (1-143). Il est connu depuis longtemps que la masculinité est déterminée par la présence du chromosome sexuel Y. C'est en 1990 que l'effet déterminant, pour l'obtention de testicules, du chromosome Y a été attribué au gène *SRY* (4). Depuis, de nombreuses études sont consacrées à comprendre son mécanisme d'action dans les gonades ainsi qu'à analyser les mécanismes moléculaires qui contrôlent son expression.

Une étude récente a démontré que chez la souris, l'interaction entre Gata-4 et son cofacteur Fog2 est essentielle pour la différenciation des gonades (139). Une réduction significative de l'expression de *SRY* au jour embryonnaire 11.5 a été observée lorsque l'interaction entre Gata-4 et Fog2 est abolie soit par l'absence de Fog2 ou par une mutation de Gata-4 qui inhibe son interaction avec Fog2. Ces résultats suggèrent un rôle pour GATA-4 et FOG2 en amont de SRY dans la voie de signalisation moléculaire de la détermination du sexe.

En effet, la présence de plusieurs éléments GATA consensus sur les promoteurs *SRY* humain et porc suggère un rôle potentiel pour la protéine GATA-4, qui est la seule de sa famille à être co-exprimée avec Sry chez la souris, comme régulateur direct du gène *SRY* (31;127). La première étape, pour comprendre le rôle de GATA-4 dans la détermination du sexe via la régulation transcriptionnelle de *SRY*, consistait à déterminer l'effet de ce facteur de transcription sur l'activité du promoteur *SRY*.

Malgré la présence de plusieurs sites GATA dans les promoteurs *SRY* du porc, de l'humain et de la souris, les premières observations ont toutefois démontré une divergence de rôle de GATA-4 entre les espèces. Chez le porc, les constructions promotrices de *SRY* contenant deux éléments GATA consensus ou plus sont activées par l'ajout de GATA-4 (voir figure 3.2). Toutefois, des constructions de longueurs équivalentes chez l'humain ne sont pas fortement activées par la présence de la protéine GATA-4, même si les

constructions humaines contiennent plus d'éléments GATA consensus que celles du porc (voir figure 3.3). Cette différence n'était pas surprenante sachant que malgré la présence de nombreux sites GATA entre les espèces, ils ne sont pas conservés aux mêmes endroits sur les promoteurs. De plus, en dehors des éléments GATA, les séquences promotrices de *SRY* porc, humain et murin sont très différentes. Il est donc fort possible que des éléments de régulation supplémentaires soient requis sur le promoteur humain et qu'il manque des co-facteurs afin que GATA-4 remplisse pleinement son rôle.

Des études antérieures ont démontré que WT1 pouvait activer le promoteur *SRY*. On retrouve différents isoformes de WT1 et il semble qu'ils aient des fonctions distinctes. Des évidences *in vitro* suggèrent que l'isoforme responsable de l'activation du promoteur *SRY* est WT1 (-KTS) tandis que des données *in vivo* suggèrent que l'isoforme WT1 (+KTS) est impliqué au niveau de la production ou de la modification de l'ARNm (91). Il a été démontré que WT1 pouvait interagir physiquement avec un co-facteur WTAP et que cette interaction avait lieu préférentiellement avec l'isoforme WT1 (-KTS) dans la région des 180 acides aminés en N-terminale (144). Cette découverte montre que WT1 peut interagir avec d'autres protéines de façon physique. Dans le contexte de la détermination du sexe, WT1 et GATA-4 sont exprimés au même moment dans les cellules de Sertoli avant que *SRY* soit exprimé. La présente étude avait aussi pour tout d'explorer la possibilité d'une coopération transcriptionnelle entre GATA-4 et WT1 pour l'activation du promoteur *SRY*.

Les résultats de cotransfection de GATA-4, WT1 et de différentes constructions de promoteurs *SRY* humain et porc appuient les précédentes études sur l'activation du promoteur *SRY* par WT1 seul, mais n'ont montré aucune coopération transcriptionnelle entre les deux facteurs (voir figures 3.4 et 3.5). Les niveaux d'activation du promoteur h*SRY* par WT1 dans la présente étude sont moins importants que ceux précédemment observés (91) et ne sont pas augmentés par la présence de GATA-4. Étrangement, il n'y pas de différence de niveau d'activation entre les isoformes WT1 (-KTS) et WT1 (+KTS), bien qu'il ait été suggéré que l'isoforme WT1 (+KTS) n'agisse pas au niveau de la transcription mais possiblement aux étapes de modification de l'ARNm ou au niveau de sa stabilité. Est-ce que l'augmentation d'activité luciférase mesurée représenterait l'activité de stabilisation

ou de modification d'ARNm de l'isoforme WT1 (+KTS) ? Il est fort improbable que cela soit le cas, car si WT1 (+KTS) possède de telles propriétés, elles sont probablement spécifiques à l'ARNm de *SRY* et dans l'étude présente, c'est l'ARNm de la luciférase qui est produit. Donc, l'augmentation d'activité luciférase mesurée se doit d'être en rapport avec l'activité du promoteur.

Une équipe de recherche a montré que lorsque l'épissage de WT1 insérait l'exon 5 dans la protéine, celle-ci agissait à titre de répresseur transcriptionnel (88). Les résultats de cotransfection de WT1 (+/-) obtenus dans la présente étude confirment ces mêmes observations. Toutefois, l'isoforme contenant l'exon 5 et le KTS, WT1 (+/+), aurait dû démontrer une répression transcriptionnelle mais mes résultats ont plutôt montré une propriété d'activation promotrice pour cette isoforme. Il est possible que l'utilisation de lignées cellulaires différentes soit responsable de ces divergences de fonctions. Les cellules 3T3, utilisées par l'équipe Wang et al., ont possiblement des cofacteurs importants pour l'accomplissement de la fonction de répression transcriptionnelle de WT1 (+/+). En effet, la fonction de répression de WT1 (+/+) se traduit peut être par la capacité de recruter une protéine, absente des cellules CV-1, qui réprime la transcription.

On constate une seconde divergence de mécanismes de régulation de promoteur *SRY* entre les espèces, lorsque l'on compare les résultats concernant les promoteurs humain et porcine avec des études subséquentes produites par un collègue au sein notre équipe de recherche portée sur le promoteur *Sry* de la souris. Chez la souris, tout comme chez l'humain, la présence de GATA-4 seule n'augmente pas l'activité du promoteur *Sry*, mais la présence seule de WT1 le fait. Toutefois, on observe une coopération transcriptionnelle en présence des deux facteurs de transcription GATA-4 et WT1 et ce dans une lignée cellulaire différente, soit les cellules HeLa.

Les divergences observées dans la régulation des promoteurs *SRY* humain, porcine et de souris peuvent s'expliquer en partie par le fait que les séquences du promoteur *SRY* de chacune de ces espèces sont très différentes. Bien que l'on retrouve un élément WT1 (WTE) potentiel près de l'ATG de chacun des gènes, les séquences de chacun de ces éléments sont différentes. C'est la même situation pour les éléments GATA consensus, bien

qu'on en retrouve de nombreux sur les promoteurs *SRY*; leurs séquences n'ont pas été conservées entre les espèces.

La régulation de *SRY* n'est probablement pas conduite par seulement deux facteurs de transcription, car WT1 et GATA-4 sont tous les deux exprimés dans le coeur tandis que *SRY* n'y est pas exprimé. Il doit donc y avoir d'autres cofacteurs pour l'activation de *SRY* qui se retrouvent dans les gonades et qui sont absent du coeur. Par exemple, une étude a démontré *in vivo* que l'interaction entre GATA-4 et son cofacteur FOG2 était essentielle pour la pleine expression de *Sry* chez la souris (139). Aussi, des recherches ont montré que SF1 et Sp1 avaient un rôle dans l'expression de *SRY* (69;70). J'ai effectué des expériences préliminaires afin de démontrer une coopération transcriptionnelle entre GATA-4 et FOG2 en transfections transitoires et, bien que les résultats ne vont pas en même sens que l'étude de Tevosian et al., il est nécessaire de pousser plus en avant cette avenue. Il est possible qu'une coopération transcriptionnelle entre WT1 et GATA-4 nécessite un troisième acteur tel que SOX9 qui se retrouve aussi dans les gonades dans la fenêtre d'expression de *SRY*.

L'augmentation d'activité enregistrée chez le promoteur p*SRY* suggère que la protéine GATA-4 utilise les éléments GATA présents sur le promoteur afin de se lier à l'ADN, d'aider la machinerie transcriptionnelle à se former sur le promoteur et de stabiliser le complexe. La première étape de validation de cette hypothèse est de prouver que la protéine GATA-4 se lie bel et bien aux éléments GATA du promoteur *in vitro* par retardement sur gel ainsi qu'à mesurer l'importance des éléments GATA consensus dans l'activation du promoteur par GATA-4.

GATA-4 se lie aux différents éléments GATA consensus du promoteur p*SRY*. Cette liaison est spécifique aux éléments GATA car la mutation du site GATA abolit sa liaison à GATA-4 (voir figure 3.6).

Tout porte à croire que la liaison entre GATA-4 et les éléments GATA consensus est responsable de l'augmentation d'activité du promoteur p*SRY* en présence de GATA-4. En effet, lorsque les sites GATA du promoteur p*SRY* sont inactivés, l'activité du promoteur retourne au niveau d'activité du promoteur minimal de 223 pb. De plus, le simple fait d'inactiver le site GATA-a proximal abolit l'activation du promoteur p*SRY* par GATA-4.

Or, en transfection transitoire dans les cellules PGR, la construction de p*SRY* de 347 pb, contenant seulement le site proximal, démontre une activité promotrice similaire à celle de 223 pb qui ne contient aucun site GATA consensus.

Ces observations soulèvent un paradoxe intéressant. Sans le site GATA-**a** proximal du promoteur p*SRY*, il n'y a pas d'augmentation d'activité promotrice mais lorsqu'il est présent seul, aucune transactivation par GATA-4 n'est observée. Cela suggère que la liaison de GATA-4 au site GATA-**a** proximal pourrait agir comme commutateur qui permettrait la liaison de GATA-4 aux autres sites GATA consensus. Ce serait ces liaisons en second lieu qui transactiveraient le promoteur p*SRY*, il s'agirait de liaison coopérative semblable à ce que l'on retrouve pour la protéine bicoïde de drosophile (145;146).

Les expériences préliminaires de retardement sur gel appuient l'hypothèse de liaison coopérative entre les protéines GATA-4 et les éléments GATA consensus du promoteur p*SRY* (voir figure 3.10). Il semble que la protéine GATA-4 se lie avec beaucoup moins d'affinité à la sonde contenant les quatre sites GATA-**a**, **b**, **c** et **d** du promoteur *SRY* porcin où le site GATA-**a** est inactivé (voir figure 3.11). En effet, en accord avec les données présentées, afin d'occuper tous les sites GATA du promoteur p*SRY* la protéine GATA-4 devrait d'abord se lier au site GATA-**a**. Cette liaison primaire pourrait causer une modification de la conformation de l'ADN favorisant la liaison de GATA-4 aux autres sites GATA.

En conclusion, un acteur important a été trouvé dans la régulation transcriptionnelle de p*SRY*. Nous croyons que par un processus de liaison coopérative, GATA-4 se lie spécifiquement aux éléments GATA consensus du promoteur p*SRY* et active l'expression du gène. Ce rôle n'est pas observé chez les 1600 pb promotrice de h*SRY*. Cette différence entre espèce est sans doute dûe à un manque de cofacteurs spécifiques tel que FOG2, SF1, Sp1 ou SOX9 ou tout simplement que le mécanisme de régulation du gène humain n'implique pas le facteur de transcription GATA-4. En accord avec la littérature, WT1 active les promoteurs *SRY* humain et porcin, mais ne démontre pas de synergie avec GATA-4 comme il le fait dans le contexte du promoteur *Sry* de souris.

Donc, on peut conclure que, malgré la fonction conservée de SRY chez toutes les espèces de mammifères, les mécanismes de régulation de l'expression de ce gène, tout comme leur séquence promotrice, sont toutefois très différents.

Chapitre V : Perspectives

La quête à la compréhension de la régulation de *SRY* est loin d'être achevée. De nombreux acteurs sont identifiés pour jouer un rôle dans le processus, mais leurs partenaires ne sont pas encore déterminés. Un nouveau rôle a été démontré dans cette étude concernant le rôle d'activateur transcriptionnel de GATA-4 sur le promoteur *SRY* porcin. De plus, les résultats permettent d'émettre une hypothèse sur le mécanisme d'action de GATA-4. La protéine GATA-4 se lierait de façon coopérative aux éléments GATA du promoteur. Des expériences préliminaires appuient cette théorie, mais des résultats plus convaincants sont nécessaires pour valider l'hypothèse. Cette étude devrait comprendre des expériences de retardement sur gel plus exhaustives comparant la liaison de GATA-4 à des sondes où les éléments GATA du promoteur p*SRY* seraient inactivés alternativement.

Il faut aussi pousser plus avant les études de cotransfections des constructions de promoteurs *SRY* des différentes espèces en clonant des portions plus longues des promoteurs afin de déterminer l'importance des éléments plus en amont que 1600 pb.

Les protéines FOG2, SF1, Sp1 et Sox9 devraient être incorporées dans des expériences de cotransfections dans des cellules hétérologues, afin de déterminer les coopérations entre GATA-4 et ces cofacteurs potentiels. Il serait intéressant de vérifier le comportement des différents facteurs de transcription dans des lignées cellulaires différentes.

Advenant la découverte de coopération entre facteurs de transcription sur le promoteur *SRY*, il faudrait vérifier par l'intermédiaire de quels sites d'ADN le complexe synergique se lie au promoteur. Des inactivations spécifiques de sites de liaison devront être effectuées sur des constructions de promoteur *SRY* afin de déterminer leur importance. Il faudrait aussi montrer si les protéines interagissent ensemble physiquement par essais de d'interaction protéine-protéine.

Des mutations dans les gènes de WT1 et Sox9 provoquent des réversions sexuelles. Advenant une coopération transcriptionnelle entre ces facteurs et GATA-4, il serait aussi

souhaitable de vérifier si les mutations de WT1 et SOX9 affectent la coopération entre ces facteurs.

Bibliographie

Reference List

1. **Matsuda M** 2003 Sex determination in fish: Lessons from the sex-determining gene of the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ* 45:397-403
2. **Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R** 1991 Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351:117-121
3. **Eicher EM, Shown EP, Washburn LL** 1995 Sex reversal in C57BL/6J-YPOS mice corrected by a Sry transgene. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350:263-268
4. **Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN** 1990 A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244
5. **Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S** 1997 Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124:1653-1664
6. **Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL** 1994 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8:2302-2312
7. **Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R** 1993 WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-691
8. **Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, Porter FD, Westphal H** 2000 The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403:909-913
9. **Kawabe K, Shikayama T, Tsuboi H, Oka S, Oba K, Yanase T, Nawata H, Morohashi K** 1999 Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. *Mol Endocrinol* 13:1267-1284
10. **Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D** 1999 A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* 8:989-996

11. **Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D** 2000 Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 14:2587-2595
12. **Murdock C, Wibbels T** 2003 Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet Genome Res* 101:302-308
13. **Shetty S, Kirby P, Zarkower D, Graves JA** 2002 DMRT1 in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element. *Cytogenet Genome Res* 99:245-251
14. **Burgoyne PS** 1988 Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 322:63-72
15. **Dym M, Lamsam-Casalotti S, Jia MC, Kleinman HK, Papadopoulos V** 1991 Basement membrane increases G-protein levels and follicle-stimulating hormone responsiveness of Sertoli cell adenylyl cyclase activity. *Endocrinology* 128:1167-1176
16. **Hay ED** 1993 Extracellular matrix alters epithelial differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 5:1029-1035
17. **Thompson EW, Blackshaw AW, Raychoudhury SS** 1995 Secreted products and extracellular matrix from testicular peritubular myoid cells influence androgen-binding protein secretion by Sertoli cells in culture. *J Androl* 16:28-35
18. **Karl J, Capel B** 1995 Three-dimensional structure of the developing mouse genital ridge. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350:235-242
19. **Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R** 1998 Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391:761-767
20. **Ginsburg M, Snow MH, McLaren A** 1990 Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110:521-528
21. **Gomperts M, Wylie C, Heasman J** 1994 Primordial germ cell migration. *Ciba Found Symp* 182:121-134
22. **MINTZ B, RUSSELL ES** 1957 Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool* 134:207-237
23. **McLaren A** 1990 Sexual differentiation. Of MIS and the mouse. *Nature* 345:111
24. **Taketo-Hosotani T, Merchant-Larios H, Thau RB, Koide SS** 1985 Testicular cell differentiation in fetal mouse ovaries following transplantation into adult male mice. *J Exp Zool* 236:229-237

25. **Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R** 1990 Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452
26. **Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI** 2000 SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 91:403-407
27. **Clepet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN** 1993 The human SRY transcript. *Hum Mol Genet* 2:2007-2012
28. **Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A** 1993 Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:814-817
29. **Daneau I, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW** 1996 Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biol Reprod* 55:47-53
30. **Parma P, Pailhoux E, Cotinot C** 1999 Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. *Biol Reprod* 61:741-748
31. **Daneau I, Pilon N, Boyer A, Behdjani R, Overbeek PA, Viger R, Lussier J, Silversides DW** 2002 The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis* 33:170-180
32. **Albrecht KH, Eicher EM** 2001 Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 240:92-107
33. **Lynch SA, Gaunt ML, Minford AM** 1993 Campomelic dysplasia: evidence of autosomal dominant inheritance. *J Med Genet* 30:683-686
34. **Cameron FJ, Sinclair AH** 1997 Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mutat* 9:388-395
35. **Hageman RM, Cameron FJ, Sinclair AH** 1998 Mutation analysis of the SOX9 gene in a patient with campomelic dysplasia. *Hum Mutat Suppl* 1:S112-S113
36. **Meyer J, Sudbeck P, Held M, Wagner T, Schmitz ML, Bricarelli FD, Eggermont E, Friedrich U, Haas OA, Kobelt A, Leroy JG, Van Maldergem L, Michel E, Mitulla B, Pfeiffer RA, Schinzel A, Schmidt H, Scherer G** 1997 Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 6:91-98

37. **Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, AgoulNIK AI, AgoulNIK IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA** 2000 A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 26:490-494
38. **Fynn-Thompson E, Cheng H, Teixeira J** 2003 Inhibition of steroidogenesis in Leydig cells by Mullerian-inhibiting substance. *Mol Cell Endocrinol* 211:99-104
39. **Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN** 1992 DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255:453-456
40. **Lovell-Badge R** 1993 Sex determining gene expression during embryogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 339:159-164
41. **Dubin RA, Ostrer H** 1994 Sry is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol* 8:1182-1192
42. **Tucker PK, Lundrigan BL** 1993 Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. *Nature* 364:715-717
43. **Tucker PK, Lundrigan BL** 1995 The nature of gene evolution on the mammalian Y chromosome: lessons from Sry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350:221-227
44. **Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN** 1993 Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature* 364:713-715
45. **Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN** 1994 Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 22:1500-1501
46. **Desclozeaux M, Poulat F, de Santa BP, Capony JP, Turowski P, Jay P, Mejean C, Moniot B, Boizet B, Berta P** 1998 Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem* 273:7988-7995
47. **Poulat F, Barbara PS, Desclozeaux M, Soullier S, Moniot B, Bonneaud N, Boizet B, Berta P** 1997 The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J Biol Chem* 272:7167-7172
48. **Trimmer EE, Zamble DB, Lippard SJ, Essigmann JM** 1998 Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry* 37:352-362
49. **Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME** 1994 Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 13:6115-6124

50. **Ng KW, Ridgway P, Cohen DR, Tremethick DJ** 1997 The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome. *EMBO J* 16:2072-2085
51. **Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der AB, Goodfellow PN** 1992 Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* 88:471-474
52. **Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwasser P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G** 1995 Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet* 56:862-869
53. **Giese K, Pagel J, Grosschedl R** 1994 Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3368-3372
54. **Jager RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G** 1992 A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet* 90:350-355
55. **Poulat F, Soullier S, Goze C, Heitz F, Calas B, Berta P** 1994 Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene SRY. *Hum Mutat* 3:200-204
56. **Mitchell CL, Harley VR** 2002 Biochemical defects in eight SRY missense mutations causing XY gonadal dysgenesis. *Mol Genet Metab* 77:217-225
57. **Veitia RA, Fellous M, McElreavey K** 1997 Conservation of Y chromosome-specific sequences immediately 5' to the testis determining gene in primates. *Gene* 199:63-70
58. **Margarit E, Guillen A, Rebordosa C, Vidal-Taboada J, Sanchez M, Ballesta F, Oliva R** 1998 Identification of conserved potentially regulatory sequences of the SRY gene from 10 different species of mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 245:370-377
59. **Lovell-Badge R, Canning C, Sekido R** 2002 Sex-determining genes in mice: building pathways. *Novartis Found Symp* 244:4-18
60. **Bergstrom DE, Young M, Albrecht KH, Eicher EM** 2000 Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis* 28:111-124
61. **Koopman P, Bullejos M, Bowles J** 2001 Regulation of male sexual development by Sry and Sox9. *J Exp Zool* 290:463-474

62. **Su H, Lau YF** 1993 Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* 52:24-38
63. **Vilain E, Fellous M, McElreavey K** 1992 Characterization and sequence of the 5'-flanking region of the human testis-determining factor SRY. *Methods Mol Cell Biol* 3:128-134
64. **Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R** 1995 Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121:1603-1614
65. **Kwok C, Tyler-Smith C, Mendonca BB, Hughes I, Berkovitz GD, Goodfellow PN, Hawkins JR** 1996 Mutation analysis of the 2 kb 5' to SRY in XY females and XY intersex subjects. *J Med Genet* 33:465-468
66. **McElreavey K, Vilain E, Barbaux S, Fuqua JS, Fechner PY, Souleyreau N, Doco-Fenzy M, Gabriel R, Quereux C, Fellous M, Berkovitz GD** 1996 Loss of sequences 3' to the testis-determining gene, SRY, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8590-8594
67. **Parker KL, Schimmer BP** 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18:361-377
68. **Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S** 1997 Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89:619-628
69. **Desclozeaux M, Poulat F, de Santa BP, Soullier S, Jay P, Berta P, Boizet-Bonhoure B** 1998 Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining SRY promoter. *Biochim Biophys Acta* 1397:247-252
70. **de Santa BP, Mejean C, Moniot B, Malcles MH, Berta P, Boizet-Bonhoure B** 2001 Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod* 64:775-783
71. **Pilon N, Daneau I, Paradis V, Hamel F, Lussier JG, Viger RS, Silversides DW** 2003 Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. *Biol Reprod* 68:1098-1106
72. **Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL** 1999 A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22:125-126
73. **Barbara PS, Moniot B, Poulat F, Boizet B, Berta P** 1998 Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-mullerian hormone receptor. *J Biol Chem* 273:29654-29660

74. **de Santa BP, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P** 1998 Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18:6653-6665
75. **Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA** 1998 Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93:445-454
76. **Giuli G, Shen WH, Ingraham HA** 1997 The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development* 124:1799-1807
77. **Tremblay JJ, Viger RS** 2001 GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142:977-986
78. **Tremblay JJ, Viger RS** 2001 Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol Reprod* 64:1191-1199
79. **Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, .** 1994 An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372:635-641
80. **Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, .** 1994 Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372:672-676
81. **Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M, .** 1994 A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 7:497-501
82. **Meeks JJ, Weiss J, Jameson JL** 2003 Dax1 is required for testis determination. *Nat Genet* 34:32-33
83. **Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP** 1999 Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397:405-409
84. **Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, .** 1990 Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-520

85. **Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA** 1990 Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-778
86. **Little M, Holmes G, Walsh P** 1999 WT1: what has the last decade told us? *Bioessays* 21:191-202
87. **Guo JK, Hammes A, Chaboissier MC, Vidal V, Xing Y, Wong F, Schedl A** 2002 Early gonadal development: exploring Wt1 and Sox9 function. *Novartis Found Symp* 244:23-31
88. **Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF** 1995 Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 10:415-422
89. **Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ, III** 1991 Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science* 253:1550-1553
90. **Kent J, Coriat AM, Sharpe PT, Hastie ND, van H, V** 1995 The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene* 11:1781-1792
91. **Rauscher FJ, III, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T** 1990 Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 250:1259-1262
92. **Larsson SH, Charlier JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van H, V, Hastie ND** 1995 Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81:391-401
93. **Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K** 1997 Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17:467-470
94. **Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P, Gessler M** 1998 Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* 7:709-714
95. **Kohsaka T, Tagawa M, Takekoshi Y, Yanagisawa H, Tadokoro K, Yamada M** 1999 Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. *Hum Mutat* 14:466-470
96. **Narod SA, Lenoir GM** 1991 Are bilateral tumours hereditary? *Int J Epidemiol* 20:346-348

97. **MILLER RW, FRAUMENI JF, Jr., MANNING MD** 1964 ASSOCIATION OF WILMS'S TUMOR WITH ANIRIDIA, HEMIHYPERTROPHY AND OTHER CONGENITAL MALFORMATIONS. *N Engl J Med* 270:922-927
98. **Pendergrass TW** 1976 Congenital anomalies in children with Wilms' tumor: a new survey. *Cancer* 37:403-408
99. **Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke U** 1978 Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* 61:604-610
100. **Francke U, Holmes LB, Atkins L, Riccardi VM** 1979 Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenet Cell Genet* 24:185-192
101. **Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, .** 1991 Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67:437-447
102. **Bruening W, Bardeesy N, Silverman BL, Cohn RA, Machin GA, Aronson AJ, Housman D, Pelletier J** 1992 Germline intronic and exonic mutations in the Wilms' tumour gene (WT1) affecting urogenital development. *Nat Genet* 1:144-148
103. **Baird PN, Santos A, Groves N, Jadresic L, Cowell JK** 1992 Constitutional mutations in the WT1 gene in patients with Denys-Drash syndrome. *Hum Mol Genet* 1:301-305
104. **Sakai A, Tadokoro K, Yanagisawa H, Nagafuchi S, Hoshikawa N, Suzuki T, Kohsaka T, Hasegawa T, Nakahori Y, Yamada M** 1993 A novel mutation of the WT1 gene (a tumor suppressor gene for Wilms' tumor) in a patient with Denys-Drash syndrome. *Hum Mol Genet* 2:1969-1970
105. **Patek CE, Little MH, Fleming S, Miles C, Charlieu JP, Clarke AR, Miyagawa K, Christie S, Doig J, Harrison DJ, Porteous DJ, Brookes AJ, Hooper ML, Hastie ND** 1999 A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2931-2936
106. **Bardeesy N, Zabel B, Schmitt K, Pelletier J** 1994 WT1 mutations associated with incomplete Denys-Drash syndrome define a domain predicted to behave in a dominant-negative fashion. *Genomics* 21:663-664
107. **Haber DA, Timmers HT, Pelletier J, Sharp PA, Housman DE** 1992 A dominant mutation in the Wilms tumor gene WT1 cooperates with the viral oncogene E1A in transformation of primary kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6010-6014

108. **Reddy JC, Morris JC, Wang J, English MA, Haber DA, Shi Y, Licht JD** 1995 WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J Biol Chem* 270:10878-10884
109. **Moffett P, Bruening W, Nakagama H, Bardeesy N, Housman D, Housman DE, Pelletier J** 1995 Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11105-11109
110. **Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge Y, Ezzell RM, Isselbacher KJ, Haber DA** 1995 Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11960-11964
111. **Hossain A, Saunders GF** 2003 Role of Wilms tumor 1 (WT1) in the transcriptional regulation of the Mullerian-inhibiting substance promoter. *Biol Reprod* 69:1808-1814
112. **Hossain A, Saunders GF** 2001 The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 276:16817-16823
113. **Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A** 1999 YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126:1845-1857
114. **Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A** 2001 Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106:319-329
115. **Ko LJ, Engel JD** 1993 DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13:4011-4022
116. **Merika M, Orkin SH** 1993 DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13:3999-4010
117. **Orkin SH** 1998 Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol* 42:927-934
118. **Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB** 1993 Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13:2235-2246
119. **Kelley C, Blumberg H, Zon LI, Evans T** 1993 GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development* 118:817-827
120. **Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T** 1994 GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269:23177-23184

121. **Morrissey EE, Ip HS, Lu MM, Parmacek MS** 1996 GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol* 177:309-322
122. **Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS** 1997 GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol* 183:21-36
123. **Suzuki E, Evans T, Lowry J, Truong L, Bell DW, Testa JR, Walsh K** 1996 The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics* 38:283-290
124. **Evans T, Felsenfeld G** 1989 The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell* 58:877-885
125. **Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH** 1989 Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339:446-451
126. **Yamamoto M, Ko LJ, Leonard MW, Beug H, Orkin SH, Engel JD** 1990 Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev* 4:1650-1662
127. **Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, 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* 125:2665-2675
128. **Siggers P, Smith L, Greenfield A** 2002 Sexually dimorphic expression of Gata-2 during mouse gonad development. *Mech Dev* 111:159-162
129. **Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, Ito E, Nishimune Y, Engel JD, Yamamoto M** 1994 Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development* 120:1759-1766
130. **Lei N, Heckert LL** 2004 Gata4 regulates testis expression of Dmrt1. *Mol Cell Biol* 24:377-388
131. **Tremblay JJ, Viger RS** 1999 Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol* 13:1388-1401
132. **Lu JR, McKinsey TA, Xu H, Wang DZ, Richardson JA, Olson EN** 1999 FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol* 19:4495-4502

133. **Tremblay JJ, Hamel F, Viger RS** 2002 Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity. *Endocrinology* 143:3935-3945
134. **Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M** 1997 The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J* 16:5687-5696
135. **Sepulveda JL, Belaguli N, Nigam V, Chen CY, Nemer M, Schwartz RJ** 1998 GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol Cell Biol* 18:3405-3415
136. **Lee Y, Shioi T, Kasahara H, Jobe SM, Wiese RJ, Markham BE, Izumo S** 1998 The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Cell Biol* 18:3120-3129
137. **Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN** 1998 A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-228
138. **Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M** 2000 GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J* 19:2046-2055
139. **Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH** 2002 Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129:4627-4634
140. **Wang ZY, Qiu QQ, Enger KT, Deuel TF** 1993 A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8896-8900
141. **Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, van H, V, Hastie ND** 1992 Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science* 257:235-237
142. **Hirvonen SJ, Santti H, Janne OA, Palvimo JJ** 2002 GC-rich elements flanking the transcription start site govern strong activation on the SNURF gene. *Biochem Biophys Res Commun* 291:897-902
143. **Wilhelm D, Englert C** 2002 The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl. *Genes Dev* 16:1839-1851
144. **Little NA, Hastie ND, Davies RC** 2000 Identification of WTAP, a novel Wilms' tumour 1-associating protein. *Hum Mol Genet* 9:2231-2239

145. **Burz DS, Rivera-Pomar R, Jackle H, Hanes SD** 1998 Cooperative DNA-binding by Bicoid provides a mechanism for threshold-dependent gene activation in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 17:5998-6009
146. **Ma X, Yuan D, Diepold K, Scarborough T, Ma J** 1996 The *Drosophila* morphogenetic protein Bicoid binds DNA cooperatively. *Development* 122:1195-1206