

Génomique expressionnelle et fonctionnelle de la spermatogenèse chez la truite

Présenté par : Jean jacques Lareyre et Florence Le Gac

Courriel : Florence.legac@rennes.inra.fr

Génomique expressionnelle et fonctionnelle de la spermatogenèse chez la truite : – Profils d'expression, régulations - Etude comparée inter-espèces des profils d'expression et analyse fonctionnelle dans des lignées de poissons transgéniques (2007-2010) Florence Le Gac¹, Rémi Houlgatte², Bernard Jégou³ et Fred Chalmei³, Jean-Stéphane Joly⁴

SPERMGEN ANR-06-GANI-014

Projet soutenu dans le cadre de l'édition 2006 de l'appel à projets GENANIMAL

1_ Unité SCRIBE INRA _ campus de Beaulieu Rennes 2_ INSERM, UMR 533 Institut du Thorax NANTES

3_ INSERM, U 625 (GERHM) 4_ UPR 2197 DEPSN, CNRS Inst. de Neurosciences A. Fessard GIF-SUR - YVETTE

Mots clefs : poisson, spermatogenèse, transcription des gènes, bioinformatique, génomique comparative, transgénèse.

Résumé

Notre projet a pour objectif à terme d'identifier des réseaux transcriptionnels régulant un processus de développement fondamental pour la reproduction des espèces : la spermatogenèse .

Les objectifs spécifiques du programme concernaient 1) l'analyse des profils d'expression génique aux étapes clé de la spermatogenèse chez le poisson. Pour réaliser ce programme nous mettons en synergie les analyses morpho-physiologiques des gonades et l'étude du transcriptome testiculaire chez la truite, développées dans le laboratoire INRA, les savoir faire et outils d'annotation de gènes et d'exploitation des données du transcriptome développées par les équipes partenaires de l'INSERM. 2) Un autre objectif du programme actuel est l'obtention de promoteurs poissons, spécifiques des cellules de Sertoli ou de cellules germinales, par transgénèse en collaboration avec la plateforme Amagen. Ces promoteurs permettent maintenant de conduire analyse fonctionnelle *in vivo* en exacerbant ou en inhibant la fonction des meilleurs gènes candidats, au moment opportun et dans les cellules appropriées.

Principaux résultats obtenus et applications envisageables

1- Nous avons identifié par des approches transcriptomiques à haut débit (puce à ADNc) des gènes et réseaux géniques potentiellement impliqués dans le processus de spermatogenèse chez la truite (Mazurais et al 2005^{*}); précisé leur profil d'expression à 6 stades de développement gonadique, ainsi que dans des populations isolées enrichies en spermatogonies, spermatocytes ou cellules germinales post meiotiques. Ces profils ont permis de prédire l'origine somatique ou germinale de l' expression des gènes d'intérêt ainsi que leur spécificité tissulaire (testis ou testis et ovaire, etc..) La recherche d'orthologues dans les génomes séquencés de poisson et l'utilisation de leurs orthologues mammaliens a permis une annotation précise des gènes étudiés et donc d'y associer des termes de GenOntology pour notre interprétation des clusters de gènes co-régulés. Nous pointons plusieurs facteurs de transcription et facteurs de croissance de grand intérêt dans le développement testiculaire et la détermination des cellules germinales. Nous avons de plus comparé les profils d'expression d'orthologues truite et souris et identifié un ensemble de gènes dont l'expression pendant la spermatogenèse est maintenue au cours de l'évolution. Quelques gènes spécifiques des ostreichtiens sont aussi apparus. (Rolland et al 2009).

2- L'identification de gènes hormono-régulés est développée chez des truites mâle prépubères après supplémentation hormonale *in vivo* (stéroïdes) ou après exposition de cultures organotypiques *ex vivo* (LH, FSH de truite). a) Les androgènes et la FSH modifient considérablement l'expression génique des cellules testiculaires *somatiques* . Nous nous sommes concentrés sur plusieurs facteurs de transcription

^{*} Mazurais, D. , Montfort J. , Delalande C. , Le Gac F. . 2005. Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA arrays. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 143-154

significatifs pour les fonctions testiculaires (tels DMRT, Sox9b, Dax , Tbx1..) et sur les facteurs de la famille des TGFbeta potentiels acteurs des relations paracrines au sein de la niche germinale (tels GSDF, AMH, InhA..) dont certains sont de potentiels régulateurs négatifs de la différenciation germinale. b) Nous montrons que les traitements androgéniques font évoluer le transcriptome des cellules germinales précoces vers la différenciation méiotique (Rolland et al, 2009 et 2010 soumis) ; c) enfin nous pouvons avancer de nouvelles hypothèses concernant les rôles et mécanismes d'action moléculaires de chacune des 2 hormones gonadotropes, sujet encore très débattu chez les poissons (Sambroni et al. non publié).

3- Découvrir la fonction moléculaire ou biologique de nouveaux candidats est maintenant prioritaire.

En plus de l'appropriation d'une méthode de transgénèse efficace chez le zebrafish, les régions 5' flanquantes (environ 2 kb) de gènes exprimés spécifiquement dans la gonade de poissons ont été obtenues à partir du génome du zebrafish (*Danio rerio*) puis insérées en amont du gène rapporteur GFP. Les gènes chimériques ainsi générés ont été insérés dans le génome du zebrafish. (thèse Aude Gautier 2007-2010).

Les données obtenues montrent que la région 5' flanquante du gène *gsdf* (gonadal soma derived factor) est suffisante pour cibler une expression forte du transgène Dr_ *gsdf*:eGFP dans les cellules de Sertoli et de la granulosa. Il en est de même pour le promoteur du gène *sycp1* dans les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques. Le-promoteur du gène *vasa* permet une expression du transgène dans les ovocytes primaires prévitellogéniques et une sous-population de spermatogonies. Enfin, le promoteur du gène *rfs1* dirige l'expression du transgène dans les gonades, le coeur et, chez les juvéniles, dans le rein. Ces promoteurs peuvent être utilisés pour la surexpression ou l'inactivation ciblée de gènes candidats. (Gautier et al.). Nous lançons depuis 6 mois l'étude fonctionnelle *in vivo* par transgénèse de facteurs de croissance candidats, en commençant par le GSDF lui-même, puisqu'il s'agit d'un nouveau membre de la famille des TGFbetas spécifique des poissons (Thèse Vanessa Mella oct2009-oct2011).

4- Enfin, nous avons généré des lignées de poisson-zébre qui expriment la protéine fluorescente verte (eGFP) spécifiquement dans les spermatogonies ou les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques ou les cellules de Sertoli. Ces lignées constituent de nouveaux modèles animaux de valeur pour le suivi et la caractérisation de lignages cellulaires dans la gonade et favoriser les approches fonctionnelles *in vitro* ou *in vivo* (isolement de cellules ; suivi de différenciation sous l'influence de protéines régulatrices etc..)

Perspectives

-1) Dans la suite directe de ces travaux nous lançons l'étude fonctionnelle *in vivo* par transgénèse de facteurs de croissance candidats pour la régulation de la différenciation précoce de la spermatogenèse.

-2) Ces travaux trouvent leur prolongation dans un programme Européen, « LifeCycle » 2009-2012, dont un des « Workpackages » porte sur l'étude de la régulation et de la fonction de gènes testiculaires, avec une visée appliquée de maîtrise de la puberté des mâles chez les poissons d'intérêt aquacole.

-3) Surtout, la richesse des acquis nous met en situation de force pour initier un nouveau programme sur la niche des cellules souches de la spermatogenèse (ou SSC) qui sont CS adultes. L'objectif majeur pour les prochaines années est d'identifier des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la prolifération/différenciation des cellules souches de la spermatogenèse au sein du testicule et caractériser leur régulation par des signaux endocrines et paracrines. Thèse de Johanna Belaiche 2011-2013 et collaborations avec B Pain, ENS-INRA Lyon (SSC de poulet) P Sourdain, Univ Caen (SSC rousette).

-4) La fouille des données acquises dans Spermgen ouvrent aussi des possibilités concernant tous les stades du développement testiculaire. A titre d'exemple : la maturation finale et l'excrétion des spermatozoïdes nécessitent de modifications décisives des échanges hydrominéreaux à travers les épithéliales séminifère et du canal déférent : Les données acquises nous permettent aujourd'hui de caractériser au niveau moléculaire les modifications morpho-fonctionnelles spectaculaires de ces épithéliales sous l'influence des stéroïdes sexuels.

Publications issues des travaux soutenus dans le cadre du projet ANR

Govoroun M. ^(*), Le Gac F. ^(*), Guiguen Y. ^(*), 2006. Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. BMC Genomics 7:196 -(*) equal contribution

Rolland AD, Lareyre JJ, Goupil AS, Monfort J, Ricordel MJ, Esquerre D, Hugot K, Houlgatte R, Chalmel F, Le Gac F. 2009. Expression profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis. BMC Genomics. Nov 20:10(1):546-568.

Le Gac F., Lareyre JJ., Montfort J., Esquerre D. and Houlgatte R., 2008. Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout (article) *Cybium* Vol 32 sup2:119-121

En cours

Rolland A.D., Lardenois L., Goupil A.S., Lareyre J.J., Chalmel F., Houlgatte R., and Le Gac F. A transcriptome-wide profiling identifies androgen-responsive genes in rainbow trout testis: relevance to male gonad development and spermatogenesis onset. (2eme soumission).

Gautier A., Le Gac F., Lareyre J.J. The gsdf gene locus harbours evolutionary conserved and clustered genes preferentially expressed in fish previtellogenic oocytes. (En révision, **Gene**).

Gautier, A., Sohm F., Le Gac F., Lareyre J.J. The proximal promoter of the zebrafish gsdf gene is sufficient to mimic the spatio-temporal expression pattern of this gene in zebrafish transgenic lines but not in medaka. (soumis à **Endocrinology**).

Communications

Lareyre J.J., Ricordel M.J., Mahé S. Goupil A.S., Vizziano D., Bobe J., Guiguen Y. and Le Gac F. 2008 Two new TGF beta members are restricted to the gonad and differentially expressed during sex differentiation and gametogenesis in trout. **Cybium**, suppl.: 202.

Rolland et al. Identification of androgen-responsive genes in fish testis: Relevance to the male gonad development and spermatogenesis. **Journal of Andrology** Vol 30:131-131 International Congress of Andrology 2009 Barcelone

Gautier, A., Sohm, F., Joly, S., Le Gac, F., Lareyre, J.J. The GSDF gene locus contains clustered genes THAT are evolUtionary conserved and preferentially expressed in Gonad. 16th European Testis Workshop, 2010-05/8-12, La Biodola, Elba Island, Italy. 2010.

Gautier, A., Melin, C., Sohm, S., Joly, S., Le Gac, F., Lareyre, J.J. The proximal promoter of the zebrafish GSDF gene drives transgene expression specifically in fish testis. 2009-07/25-29, Rome, Italie. 2009.