

Université de Montréal

**Formation d'un complexe transcriptionnel spécifique aux
cellules corticotropes de l'hypophyse entre facteurs bHLH
(NeuroD1/E47) et Pitx1, un facteur à homéodomaine**

par
Gino Poulin

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en biologie moléculaire

Mars 2001

© Gino Poulin, 2001



QH
506
U54
2001
v. 007

10-1-10

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Formation d'un complexe transcriptionnel spécifique aux cellules
corticotropes de l'hypophyse entre facteurs bHLH (NeuroD1/E47) et Pitx1,
un facteur à homéodomaine**

présenté par:

Gino Poulin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Marc Therrien	président du jury
Dr. Jacques Drouin	directeur de recherche
Dr. Trang Hoang	membre du jury
Dr. Ken Hastings	examineur externe
Dr. Benoît Coulombe	représentant du doyen

Thèse acceptée : juin 2001

Remerciements

Je remercie le Dr Jacques Drouin pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son équipe de recherche et de m'avoir communiqué une partie de son grand savoir. Je tiens aussi à dire un gros merci à tous mes confrères de travail avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, tant au travail que dans la vie en général. J'aimerais particulièrement souligner l'amitié qui s'est développée au cours des six dernières années avec Bruno Delorme, Mario Maira, Christian Lanctôt, Daniel Durocher, Christine Martens, Maria Nudi, Alexandre Marcil, "Pepi", Eric Batche et Gwendal Lemarteau; mes souvenirs à votre égard sont nombreux et impérissables. Le merci final revient à Lise Laroche, Michel Chamberland et Yves Gauthier qui m'ont aidé tout au long de mes études doctorales.

Je veux finalement souligner l'incommensurable support moral que mes parents et ma grande amie Nandini m'ont donné du début jusqu'à la fin de mes études doctorales.

Sommaire

Le sujet de mon étude porte sur les mécanismes moléculaires qui déterminent la spécificité transcriptionnelle du gène POMC dans les cellules corticotropes de l'hypophyse. L'équipe du Dr Drouin a démontré que cette spécificité transcriptionnelle repose sur la combinaison synergique de deux éléments du promoteur du gène POMC (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993), un élément activé par le facteur de transcription à homéodomaine Pitx1 (Lamonerie et al., 1996) (Lanctôt et al., 1997) et l'autre par une activité bHLH spécifique aux cellules corticotropes, le complexe CUTE.

Le but de mon travail était de déterminer la nature de cette activité bHLH restreinte, de vérifier la validité de l'hypothèse de départ d'un code combinatoire synergique entre facteurs bHLHs et Pitx1, de développer un mécanisme moléculaire qui expliquerait cet effet synergique, et enfin d'essayer d'extrapoler notre modèle de spécificité transcriptionnelle à d'autres systèmes coexprimant ces facteurs de transcription.

Beta2/NeuroD1 est un facteur bHLH à expression restreinte cloné grâce à sa capacité à lier une séquence d'ADN identique à celle reconnue par le complexe CUTE (Naya et al., 1995). Ainsi, NeuroD1 devenait un excellent candidat pour expliquer l'activité restreinte du complexe CUTE. Par des expériences de retardement sur gel et de transfection transitoire, j'ai démontré : i) que NeuroD1 est présent dans le complexe CUTE, ii) que NeuroD1 possède la même spécificité que ce complexe et iii) que NeuroD1 agit en synergie avec Pitx1. De plus, l'expression de NeuroD1 dans l'hypophyse au cours du développement apparaît quelques heures avant l'expression de la POMC et cette expression est restreinte aux cellules corticotropes. L'ensemble de mes résultats démontrent donc que c'est NeuroD1 qui confère une activité spécifique au complexe CUTE (Poulin et al., 1997).

Les mécanismes synergiques impliquent souvent des interactions physiques stabilisatrices qui augmentent l'affinité de liaison à l'ADN ou permettent de recruter des cofacteurs. Dans cette optique, j'ai voulu vérifier l'hypothèse d'une

interaction physique entre les facteurs NeuroD1 et Pitx1. NeuroD1 active la transcription sous forme d'hétérodimère avec des bHLHs ubiquitaires. Par des essais d'interactions protéiques *in vivo* et *in vitro*, j'ai démontré que NeuroD1 interagit avec Pitx1 par l'intermédiaire de Pan1, un bHLH ubiquitaire partenaire de NeuroD1. Cette interaction est restreinte à la sous-famille Pitx qui inclut Pitx1, 2 et 3. De plus, cette capacité d'interaction physique directe avec Pitx1 que possède Pan1 semble conservée chez les facteurs bHLHs à expression ubiquitaire (Poulin et al., 2000a).

L'implication d'un facteur ubiquitaire dans la spécificité transcriptionnelle du gène POMC nous a permis d'élaborer l'hypothèse selon laquelle la combinaison de facteurs bHLHs et Pitxs aurait une fonction plus générale. Ainsi, j'ai testé cette idée dans le système musculaire où ces facteurs sont co-exprimés. L'activité synergique a été testée sur le promoteur d'un gène structural du sarcomère, l' α -actine squelettique. Des expériences de transfection montrent une synergie entre l'hétérodimère MyoD-Pan1 et Pitx1. Ainsi, le principe d'une activité synergique entre ces deux familles de facteurs de transcription est conservé dans un autre système. L'implication de Pitx1 dans la régulation d'un gène aussi important que l' α -actine squelettique nous a amené à postuler que Pitx1 ait une fonction importante dans le développement du muscle squelettique. Ainsi, l'analyse de l'expression de Pitx1 dans le muscle montre que son expression est restreinte à une sous-population de cellules musculaire durant le développement. Donc, à partir du postulat très ciblé d'un code combinatoire entre facteurs bHLHs et Pitx1, nous avons peut-être révélé une fonction inattendue de Pitx1 dans le développement du système musculaire. De plus, il est possible d'imaginer que d'autres systèmes utilisent un code combinatoire comparable, puisque ces facteurs sont coexprimés ailleurs, notamment dans le système nerveux, cardiaque et hématopoïétique.

Avant-propos

Les cellules dûment différenciées expriment une certaine proportion de leur patrimoine génétique définissant ainsi la mise en place d'un programme génétique qui est propre à chaque type cellulaire. La mise en place d'un programme génétique durant le développement dépend à la fois des gènes et de l'ordre dans lequel ils sont activés. L'activation de ces gènes doit nécessairement passer par la production de leurs transcrits. Alors, très tôt durant le développement, la cellule doit gérer de façon stricte la production de ses messagers pour permettre une migration, une prolifération et une différenciation cellulaire adéquate. L'importance du programme génétique dans la vie d'une cellule place donc la transcription comme un des thèmes centraux de la biologie moderne.

L'étude de l'expression des gènes est très complexe et une méthode scientifique éprouvée qui nous permet d'aborder les problèmes d'une telle complexité est le réductionnisme. En biologie moléculaire, l'utilisation de cette méthode nous amène à utiliser des modèles. Le choix du modèle est critique pour étudier avec succès le problème d'intérêt. Celui-ci doit être bien défini pour qu'il soit efficace. Le degré de définition du modèle, dans notre cas, doit nous permettre de suivre l'évolution des cellules qui nous préoccupent et les étapes critiques qu'elles traverseront au cours du temps. L'ère de la biologie moléculaire nous a aidés à raffiner la définition de plusieurs modèles en fournissant d'excellents marqueurs. Ceux-ci peuvent alors être associés à des périodes précises de la vie d'une cellule. À partir de marqueurs, nous pouvons remonter le temps pour savoir d'où vient ce type cellulaire ou à l'inverse, de prédire son futur. De plus, en déterminant comment l'expression de ces marqueurs est régulée, on peut arriver à comprendre le programme génétique mis en place qui pourrait être impliqué dans certaines étapes critiques de la différenciation du type cellulaire d'intérêt. Donc, un marqueur peut se révéler plus qu'une borne, si on découvre les molécules et les mécanismes impliqués dans sa génération.

L'utilisation de modèles produit avec le temps ce que Thomas Kuhn a appelé le paradigme. Le paradigme est une forme de modèle où les concepts fondamentaux sont acceptés par la communauté scientifique. Celui-ci possède une structure suffisamment ouverte pour permettre un questionnement et ainsi une redéfinition ou une restructuration du paradigme lui-même : il est un peu comme un tremplin qui permet aux connaissances générées à l'intérieur de ce paradigme de s'appliquer dans d'autres sphères spécialisées. Un paradigme acquiert ses lettres de noblesse par sa capacité à résoudre, avec plus de succès que d'autres paradigmes compétiteurs, certains problèmes de nature générale. La biologie possède ses grands paradigmes, mais à l'intérieur de ceux-ci ce retrouve des paradigmes plus spécialisés qui ont également pour fonction de générer des questions et qui ont le potentiel de fournir des réponses qui permettront la redéfinition à tout le moins du paradigme spécialisé et idéalement préciser ou transformer certains fondements plus généraux.

Dans ce travail, j'ai utilisé l'hypophyse de souris comme paradigme spécialisé. L'hypophyse est un organe très bien défini où il est aisé de suivre la différenciation cellulaire de tous les types cellulaires qu'elle contient. De plus, il existe de nombreuses lignées cellulaires que l'on peut utiliser en culture *in vitro* et qui correspondent à chacune des lignées hypophysaires. En utilisant la biologie moléculaire, je suis parvenu à préciser modestement le mode de différenciation des cellules corticotropes et le mécanisme permettant l'expression spécifique de l'hormone ACTH. Ce mécanisme moléculaire impliqué dans la spécificité d'expression a ensuite été extrapolé au système musculaire, dû à l'implication de facteurs communs entre ces systèmes, donnant ainsi une perspective plus générale à mon travail.

Table des matières

Remerciements	i
Sommaire	ii
Avant-propos	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xii

Chapitre I

Introduction	I
I.1. Expression des gènes	2
I.1.1 Le grand dogme	2
I.1.2 Transcription et naissance de l'ARN messager	3
I.1.3 Transcription chez les eucaryotes	4
I.1.4 Chromatine	5
I.1.5 Structure générale du promoteur	7
I.1.5.1 Le promoteur	7
I.1.5.2 La transactivation	7
I.1.5.3 La synergie	7
I.2. Facteurs de transcription	11
I.2.1 Facteurs de transcription	11
I.2.2 Règles chimiques et stéréochimiques des interactions nucléoprotéiques	11
I.2.3 Structure des facteurs à homéodomaine	13
I.2.3.1 Liaison à l'ADN	13
I.2.3.2 Interactions protéiques	14
I.2.4 Sous-famille Pitx	16
I.2.4.1 Pitx1	16
I.2.4.1.1 Profil d'expression	16
I.2.4.1.2 Intercations protéiques	17
I.2.4.1.3 Inactivation génique	18
I.2.4.2 Pitx2	20
I.2.4.2.1 Profil d'expression	20
I.2.4.2.2 Inactivation génique	21
I.2.4.2.3 Redondance transcriptionnelle avec Pitx1	21
I.2.4.3 Pitx3	21
I.2.4.3.1 Profil d'expression	21
I.2.4.3.2 Capacité transcriptionnelle	22
I.2.5 Structure des facteurs bHLHs	23
I.2.5.1 bHLHs musculaires	23
I.2.5.1.1 Clonage de MyoD	23
I.2.5.1.2 MyoD	24
I.2.5.1.3 Ablations géniques des facteurs myogéniques	25
I.2.5.2 bHLHs proneuraux	26
I.2.5.2.1 achaete-scute et atonal	26
I.2.5.2.2 MASH1 et 2	27
I.2.5.2.3 XASH-3	28
I.2.5.2.4 NeuroD1	28
I.2.5.2.5 Cascade de bHLHs proneuraux	31
I.2.5.3 bHLHs à expression ubiquitaires	32
I.2.5.3.1 E2A	32

I.2.5.3.2	Modifications posttraductionnelles	32
I.2.5.3.3	Inactivation génique	32
I.2.5.3.4	Interactions protéiques	33
I.2.5.4	bHLHs répresseurs	34
I.3.	Transcription du gène POMC	35
I.3.1	Hypophyse	35
I.3.2	Les lignées POMC de l'hypophyse : les cellules corticotropes et AtT-20, ainsi que les mélanotropes	36
I.3.3	Promoteur POMC	38
I.4.	Développement hypophysaire	40
I.5.	Signalisation hypophysaire au cours du développement	43
I.5.1	Apparition des molécules de signalisation	43
I.5.2	BMP4	44
I.5.3	Fgf8	46
I.5.4	Shh	48
I.5.5	Wnt4	52
I.5.6	Notch	53
I.5.6.1	Structure de la protéine	53
I.5.6.2	Notch le récepteur	54
I.5.6.3	Modulation de l'activité Notch	55
I.5.6.4	Activation de Notch	55
I.5.6.5	Notch chez les vertébrés	55
I.6.	Facteurs de transcription hypophysaire	56
I.6.1	Développement très précoce (e6.5 à e8.5)	56
I.6.1.2	Rpx	56
I.6.1.3	Pitx1	57
I.6.1.4	Pitx2	58
I.6.2	Développement précoce (e8.5 à e11.5)	59
I.6.2.1	Lhx3 et 4	59
I.6.2.2	Pax6	60
I.6.2.3	Prop1	60
I.6.2.4	GATA2 et BMP	61
I.6.3	Développement tardif (e11.5 à l'adulte)	63
I.6.3.1	Pit1	63
I.6.3.2	SF1	65
I.6.3.3	GR	67
I.6.3.4	ER α	68
I.6.3.5	T-pit	70
I.6.3.6	Otx1	70
I.7.	Objectifs de travail	72
Chapitre II		
<i>NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene</i>		74
II.1.	Abstract	75
II.2.	Introduction	76
II.3.	Materials and methods	79
II.3.1	Plasmids and oligonucleotides.	79
II.3.2	Cell culture and nuclear extracts.	79
II.3.3	Transfection assays.	80
II.3.4	Northern blot analysis.	80

II.3.5	Histochemistry.	81
II.3.6	Electrophoretic migration shift assays (EMSA).	81
II.4.	Results	82
II.4.1	Transcriptional specificity of NeuroD1.	82
II.4.2	Specificity of NeuroD1/Pan1 heterodimer exerted at DNA binding.	86
II.4.3	NeuroD1 is part of the CUTE complexes.	86
II.4.4	NeuroD1 forms active dimers with various class I bHLH factors.	89
II.4.5	NeuroD1 is restricted to corticotroph cells of the pituitary.	91
II.4.6	NeuroD1 synergizes with Ptx1, a pituitary-restricted homeodomain transcription factor.	95
II.5.	Discussion	97
II.5.1	Specific activation of the DE2C E-box.	97
II.5.2	CUTE is formed of NeuroD1 heterodimers.	98
II.5.3	NeuroD1 expression in pituitary.	99
II.5.4	NeuroD1 synergism with the homeobox factor Ptx1.	100
II.5.5	Putative role of NeuroD1 in the pituitary.	101
II.6.	Acknowledgment	103
II.7.	References	104
Chapitre III		
<i>Specific protein:protein interaction between bHLH transcription factors and homeoprotein of the Pitx family</i>		
		111
III.1.	Abstract	112
III.2.	Introduction	113
III.3.	Materials and methods	117
III.3.1	Plasmids and oligonucleotides.	117
III.3.2	Transfection assays.	117
III.3.3	Co-immunoprecipitation.	118
III.3.4	Transgenic mice.	118
III.3.5	Antibody against NeuroD1 and immunohistochemistry.	119
III.3.6	Pull-down assay.	119
III.4.	Results	120
III.4.1	Transcriptional synergism between Ptx1 and NeuroD1 requires the E box _{neuro} but not NeuroD1 <i>per se</i> .	120
III.4.2	NeuroD1 expression is restricted to corticotroph cells during pituitary development.	124
III.4.3	Pan1 interacts physically with Ptx1.	127
III.4.4	The bHLH domain of Pan1 is essential for Ptx1 interaction.	127
III.4.5	Heterodimers formed between NeuroD1 and Pan1 can interact with Ptx1.	127
III.4.6	The Ptx1 homeodomain (HD) is sufficient for Pan1 interaction.	130
III.4.7	Pan1 interaction is restricted to the Pitx subfamily.	132
III.5.	Discussion	134
III.5.1	NeuroD1 and POMC transcription.	134
III.5.2	Specificity of bHLH / HD interactions.	136
III.5.3	A developmental code involving homeodomain and bHLH factors.	141
III.6.	Acknowledgment	142
III.7.	References	143
Chapitre IV		
<i>Discussion</i>		
		152

IV.1. NeuroD1 et la différenciation corticotropique	153
IV.1.1 Ablation génique de NeuroD1	153
IV.1.2 Rôle de la boîte _{neuro} dans la spécificité transcriptionnelle du gène POMC	154
IV.1.3 Cascade putative de facteurs bHLHs corticotropiques	155
IV.1.4 Facteur bHLH en amont de la cascade corticotropique	156
IV.1.5 Facteur bHLH en aval de la cascade corticotropique	157
IV.1.6 Identification de facteurs bHLHs dans l'hypophyse en développement	158
IV.2. La voie Notch dans la différenciation des cellules corticotropes	158
IV.3. Synergisme bHLH-Pitx	160
IV.4. Conclusion	163
<i>Annexe I</i>	<i>165</i>
<i>Annexe II</i>	<i>167</i>
<i>Annexe III</i>	<i>169</i>
<i>Annexe IV</i>	<i>171</i>
<i>References</i>	<i>173</i>

Liste des tableaux

Tableau I.1 Apparition des facteurs de transcription hypophysaire durant le développement. __ 71

Liste des figures

<i>Figure I.1. Transactivation d'un promoteur.</i>	10
<i>Figure I.2. Modules protéiques associés à la famille des homéodomains.</i>	16
<i>Figure I.3. Représentation schématique de la différenciation des cellules hypophysaires, du développement de l'hypophyse et de leurs proportionnalités chez l'adulte.</i>	36
<i>Figure I.4. Développement hypophysaire.</i>	42
<i>Figure.5 Modèle d'antagonisation des signaux de positionnement cellulaire et de prolifération entre Fgf8 et Shh/Bmp2 à e11.</i>	51
<i>Figure II.1. Schematic representation of the rat POMC promoter (-480 to +63 bp).</i>	84
<i>Figure II.2. Specificity of NeuroD1 activation of POMC promoter E-boxes.</i>	85
<i>Figure II.3. Specific DE2C binding of NeuroD1/Pan1 heterodimers.</i>	87
<i>Figure II.4. CUTTE complexes contain NeuroD1.</i>	88
<i>Figure II.5. Pan1, Pan2, ITF2, and ME1a/b can dimerize with NeuroD1.</i>	90
<i>Figure II.6. DE2C-binding activity in different pituitary lineages (αT3, GH3 and AtT-20 cells).</i>	92
<i>Figure II.7. Cellular localization of NeuroD1 mRNA in pituitary.</i>	94
<i>Figure II.8. Reconstitution of NeuroD1 synergism with Pitx1.</i>	96
<i>Figure III.1. Binding site requirement for synergism between NeuroD1/Pan1 heterodimers and Pitx1.</i>	122
<i>Figure III.2. Pituitary expression of POMC-luciferase transgenes.</i>	123
<i>Figure III.3. Correlation of NeuroD1 and POMC expression during pituitary development.</i>	125
<i>Figure III.4. Direct interaction between Pan1 bHLH domain and Pitx1 homeodomain.</i>	129
<i>Figure III.5. Pitx1 homeodomain can interact in vivo with Pan1.</i>	131
<i>Figure III.6. Pan1 interaction is specific to Pitx family.</i>	133
<i>Figure III.7. Specificity of interactions between Pitx homeodomain and bHLH dimers.</i>	139
<i>Figure annexe I. L'inactivation génique de NeuroD1 cause un retard dans l'expression du gène POMC.</i>	166
<i>Figure annexe II. La forme constitutivement active de Notch (Notch IC) réprime l'activité du promoteur du gène POMC en bloquant la synergie bHLH-Pitx.</i>	168
<i>Figure annexe III. La synergie bHLH-Pitx est aussi observée sur le promoteur de l'α-actine squelettique.</i>	170
<i>Figure annexe IV. Pitx1 est exprimé dans une sous-population de cellules musculaires du membre postérieur.</i>	172

Liste des abréviations

6-OHDA : 6-hydroxydopamine
A : Adénine
ACTH : Adrenocorticotropic hormone
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
APC : adenomatous polyposis coli
arm : Armadillo
ARN : Acide ribonucléique
ARN poly : ARN polymerase
ARNm : ARN messenger
AS-C : Achaete-Scute Complex
ASMD : Anterior segment mesenchymal dysgenesis
Asn : Asparagine
ATBF1 : AT rich binding factor 1
ATP : Adénosine triphosphate
AV : ancrage vulvaire
bHLH : Basic helix-loop-helix
BMP : Bone morphogenetic protein
BMPR : BMP receptor
BNA : Bourrlet neural antérieur
Brn4 : Brain factor 4
bZIP : basic leucine zipper
C : Cytosine
CAT : Chloramphenicol acetyl transferase
CBP : CREB-binding protein
CBF1 : CAAT binding factor 1
CE3 : Central element 3
ci : cubitus interruptus
CLIM : Co-factor of Lim-homeodomain protein
CMV : Cytomegalo virus
cPitx : Chicken Pitx

CRH : Corticotropin releasing hormone
CTD : Carboxy terminal domain
CUTE : Corticotrope Upstream Transcription Element
Cys : Cystéine
Da : dalton
DBD : DNA-binding domain
DE2C : Distal element 2C
DPitx : *Drosophila* Pitx
Dpp : Decapentaplegic
Dsh : Dishevelled
DSL : Delta-serrate-lag2
df : Ames dwarf
dw : Snell dwarf
dw^j : Dwarf jackson
e : embryonic day
EGF : Epidermal growth factor
Egr1 : Early growth reponse 1
en : Engrailed
ER α : Estrogen receptor alpha
Exd : Extradenticle
Fgf : Fibroblast growth factor
FgfR : Fgf receptor
Fz : Frizzled
FSH : Follicle-stimulating hormone
Ftz : Fushi tarazu
G : Guanine
GAL4 : Galactose factor 4
GH : Growth hormone
Gln : Glutamine
GnRH : Gonadotropin releasing hormone
GnRH-R : GnRH-receptor
GR ; Glucocorticoid receptor
HD : Homeodomain
HDAC : Histone deactylase

HES : Hairy and Enhancer of Split
hh : Hedgehog
HHS : hypothalamo-hypohyso-surrénalien
HNF : Hepatocyte nuclear factor
HMG : High mobility group
HTH : Helix-turn-helix
Id : Inhibitor of DNA binding
IGF : Insulin-like growth factor
Isl1 : Insulin gene enhancer binding protein 1
LBD : Ligand binding domain
Lbd : LIM-binding domain
LH : Luteinizing hormone
Lhx : Lim-homeobox factor
Luc : luciferase
MHC : Myosin heavy chain
MLC : Myosin Light chain
NGFI-B Nerve growth factor inducible-B
nGRE : Negative glucocorticoid receptor element
NLS : Nuclear localisation signal
NuRE : Nur-response element
OCH : organes internes chordotonaux
OSE : Organes sensoriels externes
pb : Paire de base
ptc : Patched
PC : Proconvertase
PLC : Phospholipid C
P-Frk : Pituitary forkhead
Pit1 : Pituitary specific factor1
Pitx : Pituitary homeobox
PKA : Protein kinase A
PKC : Protein Kinase C
POMC : Pro-opiomélanocortine
POU : Pit1- Oct-Unc86
PRL : Prolactine

RAR : Retinoic acid receptor
RFLP : Restriction fragment length polymorphism
RLIM : Ring finger LIM domain-binding protein
RSV : Rous sarcoma virus
RXR : 9-cis-retinoic acid receptor
SF1 : Steroidogenic factor 1
Shh : Sonic hedgehog
Six : Sine oculis homeobox
SMAD : Mother against decapentaplegic
Smo : Smoothen
SRB : Suppressors of RNA polymerase B
SWI/SNF : Switch/sucrose non-fermenting
T : Thymine
TAF : TBP-associated factor
TBP : TATA-binding protein
Tbx : T box (brachyury box)
T-C-F : Treacher-Collins-Franceschetti
TGF β : Transforming growth factor beta
Thr : Thréonine
T-Pit : T-box pituitary factor
TR : Thyroid hormone receptor
TSH : Thyrotropin stimulating hormone
Tyr : Tyrosine
Unc : uncoordinated
VU : ventrale utérine
Wg : Wingless
Wnt : Wingless and int1
yto : you-too
ZnF : Zinc finger
 α -GSU : Glycoprotein subunit alpha
 α -MSH : Melanocyte stimulating hormone alpha
 β -End : Beta-endorphine

Chapitre I

Introduction

I.1. Expression des gènes

I.1.1 Le grand dogme

Aujourd'hui, nous tenons pour acquis que les chromosomes sont le véhicule de l'hérédité, mais cette question fut longuement débattue au XIX^{ième} siècle. Mendel est certainement une figure importante dans l'élaboration de la théorie chromosomique de l'hérédité avec ses croisements de petits pois et son célèbre ouvrage "Versuche über Pflanzen-hybriden" publié en 1866. Ses expériences démontraient la conservation de certains caractères à travers les générations et servirent à établir la loi de leur distribution. Cependant, il faudra attendre jusqu'en 1903 pour pouvoir faire le lien entre la distribution des caractères et l'élément porteur de l'hérédité, le chromosome. C'est Walter S. Sutton avec sa théorie chromosomique de l'hérédité qui expliquera les résultats de Mendel par le fait que les chromosomes sont en groupe diploïde et que durant la méiose, chaque gamète reçoit une copie de chromosomes (Sutton, 1903). Comme les chromosomes sont constitués de protéines et d'acides nucléiques, la question était ouverte pour savoir lequel de ces constituants servait de matrice à la conservation des caractères génétiques. En 1928, Frederick Griffith transforme des bactéries non virulentes à partir de bactéries virulentes tuées par la chaleur. Donc, le support génétique était résistant à la chaleur et pouvait se transmettre d'une souche à l'autre (Griffith, 1928). En 1944, Avery s'aperçoit que seule la désoxyribonucléase pancréatique parvient à bloquer la transformation par ces extraits bactériens virulents, alors que les protéases ou les ribonucléases en sont incapables. Il conclut que l'ADN était bien responsable de l'hérédité (Avery, 1944). Finalement, la découverte de la double hélice de Watson-Crick allait poser le grand dogme de la biologie moléculaire : réplication, transcription, et traduction (Watson and Crick, 1953a) (Watson et al., 1989a; Watson et al., 1989b; Watson and Crick, 1953b). Par la suite, la chasse aux enzymes était ouverte pour chacune de ces étapes et l'ère de la biologie moléculaire était lancée.

1.1.2 Transcription et naissance de l'ARN messager

Il a été rapidement démontré que l'ADN codait pour des acides aminés grâce à des expériences de mutagenèse (Crick, 1968). Il n'y avait pas d'évidence cependant, que la synthèse protéique s'effectuait directement sur le gène, Alors qu'il y avait de fortes indications que l'information était recopiée en ARN (Watson, 1963). L'intérêt, à cette époque, s'est porté sur l'ARN ribosomal parce que les ribosomes sont le siège de la synthèse protéique et qu'il est très abondant. Ainsi, on présumait qu'il y avait une classe spécifique de ribosome pour la synthèse de chacune des protéines. Ce modèle allait bientôt rencontrer quelques difficultés. Le premier problème fut celui de la dimension des ARNr. En effet, celle-ci est constante dans les ribosomes alors que celle des protéines varie énormément. L'autre paradoxe était la variation du rapport adénine/guanine d'un organisme à l'autre, laquelle contrastait avec la constance du contenu en nucléotide des ribosomes et ne reflétait pas la variation nucléotidique de l'ADN. De plus, l'étude de la β -galactosidase avait montré que cette enzyme constituait environ 7 % du total protéique de la bactérie après induction (Pardee et al., 1959), alors que la quantité de ribosomes demeurait toujours constante (Crick, 1963). Une expérience qui ébranla encore plus ce modèle fut l'addition de fluorouracile au milieu de culture bactérien qui inactive l'enzyme β -galactosidase. Dans ces expériences, l'activité β -galactosidase disparaît très tôt après l'addition de ce composé chimique et réapparaît après son élimination. Ceci démontrait que la matrice était instable et qu'elle était générée rapidement, propriété que les ribosomes n'avaient pas. Par contre, certains invoquaient que c'était plutôt l'activité ribosomale qui variait, c'est-à-dire que la quantité de matrice demeurait stable, mais que l'activité catalytique de l'appareil de traduction augmentait (Brenner, 1965). Jacob et Monod allaient mettre fin à cette hypothèse en étudiant l'opéron Lac. Ils découvrirent dans l'opérateur une mutation qu'ils ont appelée o^c . Contrairement aux autres mutations de l'opéron, celle-ci avait la propriété exclusive d'agir en *cis*, de ne pas être complétement génétiquement et d'activer constitutivement l'opéron. Cela les conduisit à l'interprétation unique de la régulation par le répresseur *i* qui devait se

produire au niveau de l'ADN et non de l'ARN. Conséquemment, ils établissaient que c'était la quantité de matrice qui devait varier et que celle-ci devait être instable (Pardee et al., 1959; Jacob and Monod, 1961). Ceci éliminait l'ARN ribosomal et invoquait l'existence d'un autre type d'ARN, l'ARN messenger. Celui-ci devait être peu abondant puisque la majorité de l'ARN est constitué de l'ARN de transfert et ribosomal. Ensuite, se basant sur cette nouvelle théorie de la régulation des gènes, Sydney Brenner, à l'aide du bactériophage T2 et de différents isotopes qui marquent la nouvelle synthèse d'acide ribonucléique de façon très sensible, démontra que le transfert de l'information de l'ADN à la protéine se produit par l'intermédiaire de l'ARNm (Brenner et al., 1961) (Brenner, 1961; Gros et al., 1961). Ainsi, les bases fondamentales de l'étude de la régulation des gènes étaient établies.

I.1.3 Transcription chez les eucaryotes

L'étude des bactériophages et des bactéries a permis l'élaborer les mécanismes de base de la transcription. Ensuite, les chercheurs ont voulu comprendre la transcription de base et la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes. La transcription chez les eucaryotes comporte d'importantes différences par rapport aux procaryotes. La première est que chez les bactéries, le messenger est traduit simultanément alors que chez les eucaryotes, l'ARNm subit des étapes de coiffage en 5', d'épissage et d'ajout d'une queue polyA. De plus, l'ARNm bactérien est polycistronique alors que chez les eucaryotes, le messenger ne code que pour un seul polypeptide. Enfin, chez la bactérie, une ARN polymérase génère pratiquement tout l'ARN cellulaire, alors que chez les eucaryotes, il existe trois ARN polymérases. L'ARN polymérase I synthétise principalement l'ARN ribosomal ; l'ARN polymérase II, les messagers ; et l'ARN polymérase III, l'ARN de transfert. L'ARN polymérase bactérienne consiste en quatre sous-unités (a, b, b' et σ) appelé l'holoenzyme. Les sous-unités a, b, b' forment le corps principal de l'holoenzyme et la sous-unité σ s'en dissocie lors de l'élongation pour plutôt jouer un rôle dans la reconnaissance du site de liaison à

l'ADN. L'holoenzyme dont fait partie l'ARN polymérase II de mammifère est beaucoup plus complexe et comprend quatre classes différentes de facteurs : TFIIB, TFIIH et TFIIF qui sont des facteurs généraux de la transcription, un complexe de coactivateurs et de médiateurs qui interagit avec les activateurs et le CTD de l'ARN polymérase II, un complexe SRB qui agit comme corépresseur, et le complexe SWI/SNF qui remodèle la chromatine (Carey, 2000).

La transcription s'effectue en plusieurs étapes : un complexe de préinitiation est formé, après viennent les complexes d'initiation, puis d'élongation et finalement la terminaison. La première étape consiste en la liaison de TFIID à la boîte TATA du promoteur. La boîte TATA peut exceptionnellement être absente du promoteur, mais un complexe de préinitiation est quand même formé. Le complexe TFIID est au centre de la machinerie transcriptionnelle de base et est formé de la TBP et de facteurs qui lui sont associées que l'on nomme les TAFs. Ensuite, TFIIA s'associe à TFIID. Il serait cependant non essentiel à la transcription de base et jouerait, dans certains cas, un rôle dans le contrôle de la répression où il pourrait empêcher l'emplacement de TFIID via certains répresseurs. La formation du complexe de préinitiation se produit lorsque TFIIB est recruté par TFIID, ce qui permet le recrutement de TFIIF et de l'ARN polymérase II. Lorsque ce complexe est formé sa stabilité de liaison au promoteur est suffisamment élevée pour permettre de passer à la seconde étape qui consiste au recrutement de TFIIE et TFIIH. TFIIE est nécessaire au recrutement de TFIIH qui est la dernière addition au complexe d'initiation. TFIIH est un complexe de plusieurs sous-unités ; il possède une activité kinase qui phosphoryle le domaine CTD de l'ARN polymérase II ; une activité ATPase dépendante de l'ADN ; et une activité hélicase. Grâce à ces activités biochimiques, le complexe peut alors passer à la phase d'élongation au cours de laquelle l'ARNm sera synthétisé (Lemon and Tjian, 2000) (Carey, 2000).

I.1.4 Chromatine

L'ADN génomique n'est pas en état libre dans le noyau, il existe sous forme de chromatine. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Celui-ci est

formé d'histones qui sont des protéines riches en acides aminés basiques et qui s'attachent au squelette de phosphate de l'ADN. La fonction première du nucléosome est de permettre l'empaquetage du génome ; sans cette économie d'espace dans le noyau, il serait impossible qu'une cellule contienne tout son information génétique. Cependant, cet empaquetage doit être ordonné et permissif à la réplication et la transcription. Il existe deux genres de chromatine : l'euchromatine qui est plus relâchée et l'hétérochromatine qui est très compacte. L'euchromatine est permissive à la transcription, alors que l'hétérochromatine est tellement compacte que la machinerie transcriptionnelle de base est incapable de passer à travers cette structure ; on constate déjà un niveau d'organisation. La formation d'un nucléosome s'effectue par la liaison du tétramère H3-H4 sur 120 pb d'ADN, suivi successivement de deux dimères H2A-H2B; ce complexe couvre alors 160 pb. Finalement, les histones d'interliaison comme H1 interagissent avec l'ADN nucléosomale de façon stable pour former le nucléosome. Celui-ci s'organise par la suite en fibre de 10 nm pour mener à la compaction finale de l'ADN génomique. Comment cet ADN est-il ensuite réorganisé pour que la transcription ait lieu? Le nucléosome peut être méthylé, phosphorylé et acétylé : ces modifications posttraductionnelles causent des changements d'affinité entre les histones et l'ADN. Il est connu, dans le cas de l'acétylation, que les queues aminotermiales de H3 et H4 subissent alors un changement de charge et allostérique ce qui permet en quelque sorte à ces histones de se décrocher de l'ADN. De cette façon, l'ARN polymérase peut passer à travers le nucléosome. Cette activité d'acétylation est directement retrouvée chez certains coactivateurs transcriptionnels ou par interaction de ces coactivateurs avec des acétylases spécialisées (Wolffe, 1994; Wade and Wolffe, 1997; Ura et al., 1997). Un autre complexe appelé SWI/SNF est aussi impliqué dans la disruption du nucléosome et a même été retrouvé associé au domaine CTD de l'holoenzyme de l'ARN polymérase II (Wilson et al., 1996). Ce complexe contient une activité hélicase dépendante de l'ATP qui permet le remodelage de la chromatine dans une forme relâchée, rendant ainsi l'ADN accessible aux facteurs de transcription (Sudarsanam and Winston, 2000; Peterson and Workman, 2000).

I.1.5 Structure générale du promoteur

I.1.5.1 Le promoteur

La plupart des promoteurs contiennent une partie minimale qui permet à la machinerie basale de s'accrocher et de fournir une activité transcriptionnelle minimale. Par convention, le site d'initiation de la transcription commence à +1 et ce qui vient en amont à -1. TFIID est essentiel à la génération de l'activité minimale et lie le promoteur en amont du site d'initiation à environ 30pb. La séquence en ADN faisant partie du promoteur est de longueur très variable. Il est également possible de retrouver des régions importantes de régulation de la transcription à l'intérieur d'introns. Par contre, de façon générale, en amont du promoteur minimal on retrouve des séquences régulatrices positives (associées aux activateurs) ou négatives (associées aux répresseurs) ; ces activités peuvent aussi être de deux natures : spécifique ou générale. La spécificité implique des facteurs de transcription à expression restreinte qui agissent sur un petit nombre de promoteurs et l'activité générale se retrouve à travers les facteurs à expression ubiquitaires qui agissent sur de nombreux promoteurs.

I.1.5.2 La transactivation

Les facteurs de transcription sont organisés généralement en deux modules : un module qui lie une séquence d'ADN spécifique et un autre qui contient le domaine de transactivation (Ma and Ptashne, 1988; Ptashne, 1988; Lin et al., 1990; Barberis et al., 1995; Ptashne and Gann, 1997). Ces modules peuvent être sujets à des modifications posttraductionnelles. Celles-ci bloquent ou augmentent l'activité d'un des modules ou encore permettent une sous-localisation cellulaire. Le domaine de transactivation s'associe physiquement avec la machinerie basale de transcription ; de façon directe avec les facteurs de transcription généraux ou indirectement par recrutement d'un coactivateur (Lemon and Tjian, 2000).

I.1.5.3 La synergie

La régulation temporelle et la régulation quantitative de la transcription d'un gène dépendent de l'action combinée des différents éléments du promoteur. Un

phénomène observé fréquemment en transcription est la synergie. On parle de synergie lorsque l'activité transcriptionnelle combinée de facteurs de transcription est supérieure à la somme de leur activité indépendante. Ce phénomène important est associé à une grande production de messagers, à l'initiation de la transcription, et est une cible potentielle pour la régulation négative de l'expression du gène. On explique souvent la synergie par des interactions physiques entre les facteurs de transcription et la machinerie basale. Un bel exemple est le cas des gènes *bicoïde* et *hunchback* sur le promoteur du gène *hunchback*. *Bicoïde* et *hunchback* interagissent respectivement avec TAFII110 et TAFII60, lesquels font partie du complexe TFIID. Ces deux constituants de base de la machinerie transcriptionnelle sont reliés à un autre facteur général, TAFII250 (Sauer et al., 1995a; Sauer et al., 1995b). Cette interaction commune à un point névralgique du complexe transcriptionnel expliquerait l'effet synergique observé. En effet, les protéines s'associent à l'ADN avec une constante de liaison à l'équilibre K qui s'exprime par $dG=RT\ln K$ où dG est la variation de l'énergie libre de Gibbs, R est la constante des gaz, T est la température en Kelvin. La synergie serait due à une augmentation exponentielle de la constante de liaison à l'équilibre K . Cette façon, un peu simpliste, expliquerait comment toute interaction entre facteurs de transcription qui favorise la stabilité de la liaison de la machinerie basale au promoteur augmente d'une façon qui serait supérieure à la somme des activités individuelles la génération de messager (Buratowski, 1995). Les éléments synergiques à l'intérieur du promoteur peuvent être rapprochés ou éloignés de plusieurs dizaines ou centaines de paires de base. Ils peuvent dépendre de leurs positions respectives ou en être complètement indépendants ; il ne semble pas y avoir de règle. Cette activité transcriptionnelle synergique repose néanmoins sur une interaction physique entre facteurs de transcription impliqués dans la synergie et il faut donc une certaine proximité pour permettre un contact entre ces facteurs. On peut invoquer une courbure de l'ADN qui rapprocherait ces facteurs, mais cela est souvent insuffisant pour permettre une interaction convenable. Une classe de facteurs, les coactivateurs, faciliterait ces interactions à distance. Ceux-ci ne lient pas l'ADN de façon directe mais par l'entremise de facteurs de transcription. En

fait, ce sont des molécules qui font le pont entre les facteurs liés aux éléments éloignés et la machinerie de base. En plus, ces coactivateurs possèdent une activité enzymatique d'acétylation qui donne une accessibilité accrue à l'ADN pour la machinerie de base (Guarente, 1995; Hampsey and Reinberg, 1999; Glass et al., 1997; Berk, 1999; Goodman and Smolik, 2000). Donc, la régulation de l'expression des gènes repose essentiellement sur deux types d'interactions: des interactions protéiques entre l'appareil de transcription de base, les cofacteurs et les facteurs de transcription et aussi des interactions de type nucléoprotéique qui permettent la reconnaissance de motifs d'ADN précis (fig I.1).

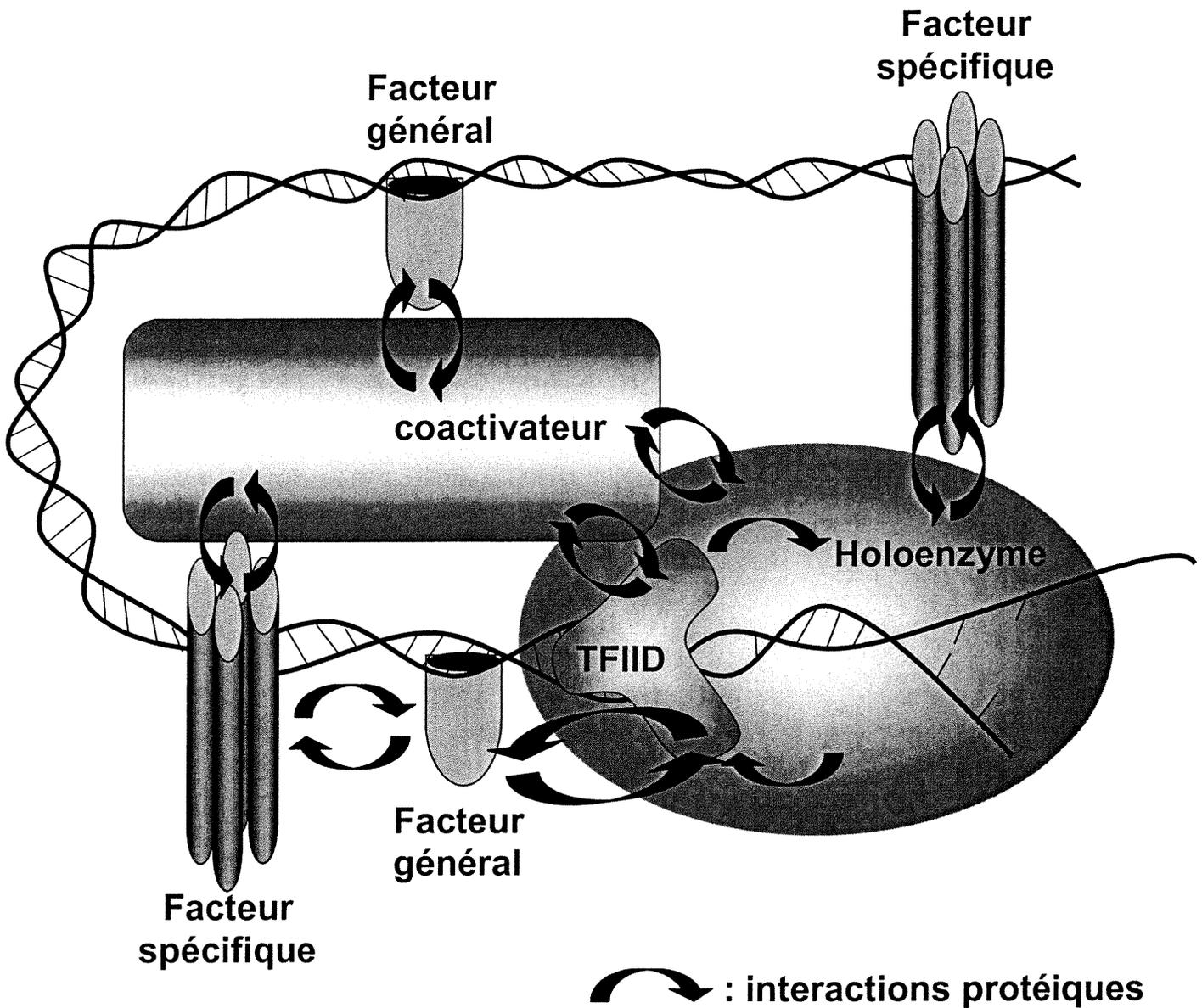


Figure I.1 Transactivation d'un promoteur. L'activation basale d'un promoteur se produit lorsque TFIID, ancré à la boîte TATA, recrute l'holoenzyme. Ensuite, les facteurs de transcription de nature générale ou spécifique stabilisent l'interaction de l'holoenzyme avec l'ADN par des interactions protéiques, celles-ci pouvant être directes ou indirectes par l'entremise des coactivateurs. Cet effet stabilisateur augmente ainsi la synthèse des ARN messagers.

I.2. Facteurs de transcription

I.2.1 Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines nucléaires qui ont la capacité de lier l'ADN de façon spécifique et de réguler l'initiation de l'activité de l'ARN polymérase par des interactions protéiques stabilisatrices ou déstabilisatrices. Les activités de liaison à l'ADN et d'interactions avec la machinerie transcriptionnelle de base servent à classer les facteurs de transcription. Ces classes sont trop nombreuses pour être traitées de façon exhaustive ici. Néanmoins, il est à propos de discuter des facteurs à homéodomaine et à domaine bHLH, ainsi que de certaines caractéristiques générales des facteurs de transcription.

I.2.2 Règles chimiques et stéréochimiques des interactions nucléoprotéiques

Le principe de la reconnaissance spécifique de l'ADN par les différents motifs protéiques repose sur la chimie entre les résidus des acides aminés et les bases de l'ADN qui sont placées à l'intérieur du sillon majeur. L'hélice- α est la conformation la plus commune qui contacte l'ADN au niveau du sillon majeur. Pour la différencier des autres structures hélicales, je l'appellerai l'hélice-sonde. L'hélice-sonde est une structure qui n'est jamais retrouvée seule, mais plutôt à l'intérieur de motifs protéiques tels que : les homéodomains, les doigts de zinc, les bHLHs et les bLeuZ. L'analyse par cristallographie de plusieurs facteurs de transcription a permis d'établir un code de reconnaissance de l'ADN où certaines bases sont reconnues spécifiquement par certains acides aminés de l'hélice-sonde. Les complexes nucléoprotéiques sont formés grâce aux interactions chimiques faibles : les ponts hydrogènes et les interactions hydrophobiques. Celles-ci se produisent entre les bases nucléiques et les chaînes latérales des acides aminés, et parfois avec les molécules d'eau placées entre les bases et les résidus. Chaque résidu ou base peut être accepteur ou donneur de protons

hydrogènes pour former le lien hydrogène. Par exemple, les acides glutamique et aspartique sont des accepteurs de protons et forment des ponts hydrogènes exclusivement avec les bases C ou A. Par contre, les sérines, cystéines et thréonines sont à la fois accepteurs et donneurs de protons, ce qui leur permet d'interagir avec les quatre bases nucléiques. Selon le même raisonnement, les acides aminés arginine et lysine ne peuvent pas former de lien hydrogène avec la base C, parce que celle-ci n'a pas d'accepteur. Les liaisons hydrophobes entre molécules d'ADN et protéines sont aussi très importantes. Le groupement méthyle de la base T est une cible de choix dans le sillon majeur pour l'interaction hydrophobique. Les résidus hydrophobes comme l'alanine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et la thréonine peuvent reconnaître la base T ou la base C. Cependant, cette dernière est reconnue avec moins de force due à sa plus faible hydrophobicité. L'effet ionique est aussi impliqué dans la reconnaissance d'une base. Ainsi, l'arginine et la lysine se lient fortement à la base G, à cause d'une charge négative accrue sur cette base comparée aux bases A et T. Certains résidus forment des ponts hydrogènes avec deux paires de base consécutives pour ajouter à la stabilité de la liaison à l'ADN. Ces résidus sont de trois types: double accepteur (Asp et Glu), double donneur (Arg et Lys) ou accepteur-donneur (Asn, Gln, Cys, Ser, Thr et Tyr) (Suzuki, 1994).

La liaison à l'ADN est très complexe et la stéréochimie du module protéique qui contacte l'ADN est très importante. Certaines règles complémentaires aux règles chimiques ont quand même pu être établies pour former un code de reconnaissance stéréochimique. Une première règle est la contrainte de la géométrie de liaison de l'hélice-sonde. Cette structure sonde le sillon majeur et possède une géométrie à sa surface d'interaction avec l'ADN qui dépend d'autres éléments de structure. Par exemple, les hélices 1 et 2 de l'homéodomaine sont positionnées en perpendiculaire sur l'hélice 3, ceci réduit la liberté de mouvement en créant une géométrie singulière. Cette géométrie de liaison donne une inclinaison à l'hélice-sonde qui rend les résidus C-terminaux plus éloignés du sillon majeur que les résidus situés en N-terminal, ce qui permet à certaines

chaînes latérales d'interagir avec les phosphates de l'ADN et à d'autres avec les bases. Ces acides aminés qui interagissent avec les phosphates sont à la surface externe de l'hélice-sonde, tandis que les autres sont distribués vers l'intérieur, cette distribution se fait à intervalle régulier le long de l'hélice-sonde. L'ensemble de ces interactions est déterminant pour la reconnaissance efficace du site. Une seconde facette de la stéréochimie est la position relative des résidus qui contactent l'ADN. L'hélice-sonde est formée de douze acides aminés (numérotés de 1 à 12), mais seulement quatre sont impliqués dans la reconnaissance directe des bases de l'ADN ; ce sont les résidus en position 1, 4, 5 et 8. Une analyse de la taille de ces résidus montre que se sont toujours des résidus de taille moyenne qui sont retrouvés à la position 1 : lorsqu'ils sont trop encombrants, l'hélice-sonde ne peut pénétrer le sillon, et par contre, s'ils sont trop petits, la distance pour contacter les bases est trop grande. Par contre, des résidus de taille variable sont retrouvés aux positions 4, 5 et 8. C'est la grosseur du résidu qui détermine quelle base sera contactée. Finalement, l'arrangement des résidus doit être fait de façon à ce que les interactions de chacun ne se croisent pas, parce que ceci produirait un encombrement stérique. On peut dire que ces règles sont respectées dans la vaste majorité des cas étudiés et qu'elles sont typiques aux facteurs de transcription, que ce soit un homéodomaine, un domaine bHLH ou un doigt de zinc (Suzuki, 1994; Pabo and Sauer, 1992; Pabo and Nekludova, 2000).

1.2.3 Structure des facteurs à homéodomaine

1.2.3.1 Liaison à l'ADN

L'homéodomaine est constitué de soixante acides aminés qui forment un motif hélice-tour-hélice. Ces acides aminés forment trois hélices ; la première et la deuxième se juxtaposent perpendiculairement à la troisième, laquelle est la plus longue et reconnaît la séquence d'ADN à lier (Gehring et al., 1994; Tullius, 1995). La première hélice possède en plus un bras en N-terminal dont la structure désordonnée prend une conformation spéciale lorsque l'homéodomaine se lie à l'ADN. Cette conformation permet le contact avec les phosphates de l'ADN du sillon mineur et tord l'ADN d'un angle de 30° sous l'influence de l'homéodomaine,

ce qui stabilise l'interaction (Kissinger et al., 1990; Wilson et al., 1995). Une classification a été élaborée à partir de l'acide aminé en position cinquante de l'homéodomaine qui est primordial dans la reconnaissance spécifique du site de liaison (Desplan, 1997; Duboule, 1994). Par exemple, la classe des gènes bicoïdes possède une lysine conservée en position 50 qui forme des ponts hydrogènes et un lien hydrophobe, respectivement avec les deux bases G et la base T adjacente au CC du brin opposé dans le site consensus TAATCC (Hanes and Brent, 1989; Wilson et al., 1993; Tucker-Kellogg et al., 1997).

1.2.3.2 Interactions protéiques

Les facteurs à homéodomaine sont quelques fois couplés à d'autres domaines protéiques conservés, par exemple ; l'hexapeptide, le domaine PAIRED, le domaine POU, le domaine LIM, et le domaine FACE (fig 1.2). L'hexapeptide est un domaine situé en N-terminal de l'homéodomaine des gènes HOX. La famille des facteurs à homéodomains *exd/Pbx* interagit avec l'hexapeptide et module la spécificité de liaison à l'ADN par changement conformationnel et liaison directe à l'ADN (Piper et al., 1999; Wolberger et al., 1991; Chang et al., 1995; Chan et al., 1996). Le domaine PAIRED est un domaine de liaison à l'ADN qui combiné à l'homéodomaine permet une augmentation de la spécificité de liaison. Le domaine PAIRED est bipartite et est en fait constitué de deux domaines : le domaine PAI, et le domaine RED. Tous deux contiennent un motif hélice-tour-hélice. Le PAI contacte le sillon majeur par son hélice-sonde et le sillon mineur est fixé par deux structures : le tour β et la séquence d'attachement entre le PAI et le RED. Le domaine RED ne semble pas contacter l'ADN. Pour ajouter à la complexité, un dimère peut être formé suivant la liaison à l'ADN d'un monomère, ce qui permettrait un contact coopératif (Desplan, 1997; Jun and Desplan, 1996; Wilson et al., 1993; Treisman et al., 1991). Le domaine POU contient soixante-quinze acides aminés situés aussi en N-terminal de l'homéodomaine. Celui-ci peut lier l'ADN sous forme de monomère ou dimère. L'espace entre le domaine POU et l'homéodomaine est variable chez les membres de cette famille d'homéodomains, ce qui altère le mode de liaison à

l'ADN. Par exemple, le domaine POU de Oct1 lie le brin d'ADN opposé à celui qu'utilise l'homéodomaine, mais le domaine POU de Pit1 lie le même brin. L'homodimérisation s'effectue entre l'homéodomaine POU et le domaine POU. Ce sont l'arginine 58, la valine 59 et la lysine 60 de l'homéodomaine qui sont impliqués dans cette interaction via des ponts hydrogènes (Jacobson et al., 1997). Les domaines LIMs sont des structures en doigts de zinc ne liant pas l'ADN, ceux-ci servant plutôt à produire des interactions protéiques. Ces interactions sont classifiées en trois types : interaction directe entre deux facteurs de transcription, interaction indirecte médiée par les cofacteurs de type Lbd (LIM-binding domain) et un autre type d'interaction indirecte médiée par RLIM (Ring finger LIM domain-binding protein) qui recrute le complexe de répression transcriptionnelle Sin3a (Hobert and Westphal, 2000). Le domaine FACE est constitué de quatorze acides aminés situés en carboxy-terminal de l'homéodomaine et il est conservé chez certains des facteurs à boîte homéo exprimés dans la région craniofaciale de différentes espèces. Il servirait d'interface de dimérisation protéique. Dans le cas de Pitx2, une interaction intramoléculaire dépendante du domaine FACE bloquerait constitutivement son activité transcriptionnelle. Par contre, lors de la synergie entre Pit1 et Pitx2, l'homéodomaine serait démasqué après interaction du domaine FACE avec Pit1, ce qui produirait la synergie observée entre ces facteurs (Amendt et al., 1999; Gage et al., 1999a). Tous ces modules protéiques permettent des interactions qui augmentent l'affinité et la spécificité de liaison à l'ADN, soit par modification conformationnelle de l'homéodomaine ou par liaison directe de ces motifs à l'ADN.

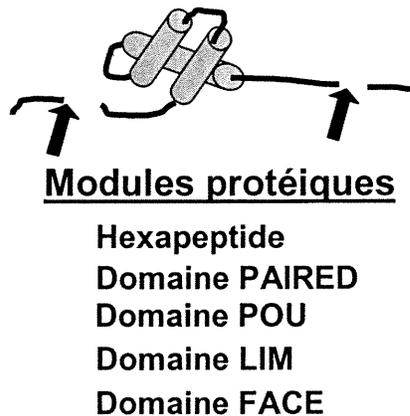


Figure I.2 Modules protéiques associés à la famille des homéodomaines.

I.2.4 Sous-famille Pitx

I.2.4.1 Pitx1

I.2.4.1.1 Profil d'expression

La famille Pitx comprend trois membres et ceux-ci sont hautement homologues à l'intérieur de l'homéodomaine (Drouin et al., 1998a). Pitx1 est le prototype de la famille et fut cloné dans notre laboratoire par sa capacité à lier l'élément CE3 du promoteur POMC renommé l'élément Pitx1 (Lamonerie et al., 1996). Pitx1 est exprimé très tôt au cours du développement murin, soit à e6.8 dans le mésoderme caudal de l'embryon en gastrulation et à e7.5, où on le retrouve dans l'allantoïde. Cet organe est une structure extra-embryonnaire qui conserve les produits toxiques du métabolisme de l'embryon, prévenant ainsi son intoxication. L'allantoïde est formée par la splanchnopleure qui est elle-même issue de l'endoderme et du mésoderme de la plaque latérale où Pitx1 est exprimé. L'expression de Pitx1 se poursuit dans le mésoderme de la plaque latérale postérieure d'où provient le mésenchyme des bourgeons des membres postérieurs qui produira les os, le cartilage et les tendons. Pitx1 est aussi exprimé

au pôle antérieur à e8.5 dans le stomodeum qui est l'ébauche embryonnaire de la bouche. De cette structure dérive tout l'épithélium de la bouche, des dents et du nez, ainsi que la poche de Rathke qui donnera lieu à l'adénohypophyse. La première arche branchiale exprime un gradient proximodistal de Pitx1, ce qui expliquerait l'expression retrouvée dans le cartilage de Meckel et dans le muscle de la langue (Lanctôt et al., 1997).

1.2.4.1.2 Interactions protéiques

Plusieurs promoteurs hypophysaires sont transactivés par Pitx1 : GH, PRL, GnRH-R, TSH β , LH β , α -GSU et POMC (Tremblay et al., 2000). L'activation transcriptionnelle se fait par la liaison de Pitx1 au site consensus (TAAAt/gCC) retrouvé à l'intérieur de ces promoteurs. Une propriété récurrente de ce facteur est son action combinatoire avec d'autres facteurs de transcription à expression restreinte : Pit1 (Szeto et al., 1996), SF1 (Tremblay et al., 1999), Egr1 (Tremblay and Drouin, 1999) et Lhx3 (Tremblay et al., 1998a; Bach et al., 1997). Cette combinaison de facteurs produit un effet transcriptionnel synergique et spécifique qui implique une interaction physique directe. Pitx1 a d'ailleurs été également cloné dans un autre laboratoire conformément à sa capacité à interagir, en essai double hybride dans la levure, avec le domaine de transactivation de Pit1 (Szeto et al., 1996). Pit1 est un facteur à homéodomaine exprimé dans les cellules somatotropes, lactotropes et thyrotropes qui expriment respectivement la GH, la PRL et la TSH β (Simmons et al., 1990; Ingraham et al., 1988). Pitx1, de même que Pit1, transactivent ces promoteurs hormonaux respectifs à divers degrés, mais leurs activités combinées deviennent synergiques, excepté dans le cas du promoteur TSH β (Mangalam et al., 1989; Tremblay et al., 1998a). SF1 est un facteur de transcription hypophysaire qui fait partie de la famille des doigts de zinc et qui possède un patron d'expression restreint aux cellules gonadotropes qui expriment l' α -GSU, la LH β et la FSH β (Tremblay et al., 1999; Ingraham et al., 1994; Parker and Schimmer, 1997). Une synergie est observée sur le promoteur LH β , ainsi qu'une interaction directe entre SF1 et Pitx1. Egr-1 est un facteur à doigts de zinc qui régule l'expression de LH β ; les hypophyses de souris où le

gène *Egr1* a été inactivé montrent une diminution importante de l'expression de la LH β (Lee et al., 1996; Topilko et al., 1998). *Pitx1* et *Egr-1* activent le promoteur LH β en synergie et interagissent physiquement (Tremblay and Drouin, 1999). *Lhx3* est un facteur à homéodomaine de la famille LIM (Sheng et al., 1996) qui active le promoteur de l' α -GSU. Lorsque le facteur *Lhx3* est coexprimé avec *Pitx1* ils agissent ensemble pour activer la transcription de façon synergique. Contrairement aux autres mécanismes synergiques, celui-ci impliquerait des interactions indirectes par les cofacteurs *Clim1* et *Clim2* qui interagissent physiquement avec les domaines LIMs retrouvés entre autres dans les protéines *Isl-1* et *Lhx3*. Ces molécules permettraient l'intégration de complexes protéiques qui comprendraient *Pitx1* et *Lhx3*, *Pitx1* interagissant directement avec *CLIM1* ou *2* et ces derniers, directement avec *Lhx3* (Bach et al., 1997).

1.2.4.1.3 Inactivation génique

L'ablation génique de *Pitx1* cause plusieurs problèmes au niveau embryonnaire. Néanmoins, les embryons peuvent être menés à terme et décèdent rapidement à la naissance. La mort serait probablement due à un problème d'alimentation causé par l'absence d'une mâchoire inférieure fonctionnelle. On observe dans les embryons *Pitx*^{-/-}, une malformation craniofaciale, une diminution de l'expression de l' α -GSU, TSH β , LH β et FSH β , une augmentation de l'expression de l'ACTH, et un problème de positionnement cellulaire au niveau des membres postérieurs (Lanctôt et al., 1999a; Szeto et al., 1999). La malformation craniofaciale rappelle le syndrome de Treacher-Collins-Franceschetti qui est une maladie autosomale dominante liée au chromosome 5q31 qui est la région chromosomique de *Pitx1* (Crawford et al., 1997). Par contre, les souris hétérozygotes *Pitx1*^{+/-} ne montrent pas de défauts craniofaciaux. Toutefois, les malformations craniofaciales observées sont beaucoup plus marquées chez la souris *Pitx1*^{-/-} que dans le syndrome T-C-F. Les embryons *Pitx1*^{-/-} ont un palet ouvert, une langue fourchue et au niveau de la mandibule, on note l'absence du cartilage de Meckel, de l'os tympanique et de l'os gonial. Toutes ces structures sont des dérivés du mésenchyme de la première arche branchiale (Lanctôt et al.,

1997). Le phénotype des membres postérieurs a donné lieu à des interprétations d'ordre évolutives qui suggèrent que *Pitx1* sert à spécifier l'identité du membre. Ainsi, en absence de *Pitx1*, le membre postérieur serait transformé en membre antérieur ou en un membre ancestral, précurseur commun des membres antérieurs et postérieurs. La première interprétation se défend logiquement lorsque la morphologie des os est prise en considération. Ainsi, l'absence de rotule qui n'existe pas dans le membre antérieur, le ratio du diamètre péroné/tibia est semblable à celui du radius/cubitus, l'orientation spatiale du tibia et du péroné par rapport au tissu mou ressemble à celle du radius et du cubitus. Les noeuds de Zucker au niveau de la cheville sont absents, comme dans le poignet et le calcanéum serait transformé en os pisiforme qui est une structure exclusivement associée aux membres antérieurs. Ainsi, plusieurs critères sont compatibles avec une transformation du membre postérieur en membre antérieur. Par contre, l'interprétation concernant la transformation du calcanéum en os pisiforme reste controversée et ne peut malheureusement pas être supportée par des marqueurs moléculaires et elle repose donc entièrement sur des considérations anatomiques (Szeto et al., 1999). Il existe par contre des marqueurs moléculaires pour discerner une jambe d'un bras, notamment *Tbx4* et *5* (Gibson-Brown et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1996) qui sont restreint respectivement aux bourgeons postérieurs et antérieurs. Dans l'inactivation génique de *Pitx1*, la réponse demeure insatisfaisante puisque l'expression de *Tbx4* est réduite et que celle de *Tbx5* n'est pas affectée (Lanctôt et al., 1999a; Szeto et al., 1999). Par contre, les expériences de gain de fonction chez le poulet sont très intéressantes. Par exemple, une infection rétrovirale de *cPitx1*, au niveau du bourgeon antérieur mène à une expression de *Tbx4*, à l'uniformisation de la longueur des doigts, à la disparition du plumage distal et à une disparition de la flexion postérieure distale qui est caractéristique de l'aile. De plus, au niveau de la musculature de l'aile, il y aurait apparition de l'extenseur digital long qui est particulier à la jambe (Logan and Tabin, 1999). Par contre, les effets sur les os ne sont observés que dans la partie distale des similis-ailles (Szeto et al., 1999).

Les arguments en faveur de la deuxième hypothèse (transformation en ancêtre commun aux membres postérieurs et antérieurs) sont plutôt minces et reposent sur l'observation que les pythons et des fossiles de serpents possèdent des membres postérieurs qui ressemblent à ceux que l'on retrouve chez les souris dépourvues de *Pitx1* (Lanctôt et al., 1999a). Ceci n'est aussi supporté que par des considérations anatomiques qui pourraient, dans un cas comme dans l'autre, n'être qu'une coïncidence fortuite. Ainsi, le phénotype pourrait s'expliquer par la perte du mésenchyme au niveau proximal et antérodistal du membre postérieur. Alors, si le mésenchyme essentiel à la formation de la rotule est absent, il n'y aura pas de rotule, ce qui n'a rien à voir avec une resspécification. Par contre, les effets tels que l'augmentation du volume du péroné, la réorientation de l'axe tibia/péroné, l'augmentation de la longueur des doigts et la transformation musculaire sont en faveur d'un effet dû à un repositionnement cellulaire. Est-ce une transformation en membre antérieur ou en membre de python ? La question reste ouverte!

I.2.4.2 Pitx2

I.2.4.2.1 Profil d'expression

Pitx2 (ou Rieger) est un gène qui cause une maladie autosomale haploinsuffisante qui affecte les dents, les yeux et le nombril (Amendt et al., 1998; Semina et al., 1996). *Pitx2* est exprimé asymétriquement dans l'axe gauche-droite. Chez le poulet, son expression débute au stade 6 dans le mésenchyme de la tête de façon bilatérale symétrique. Un peu plus tard, au stade 8, on le retrouve exprimé exclusivement du côté gauche dans le mésoderme de la plaque latérale. Cette asymétrie se poursuit dans la splanchnopleure, dans le primordium cardiaque et tous les organes internes qui procèdent à une rotation dans l'axe gauche-droite. L'expression est symétrique dans l'allantoïde, le myotome épaxial, les myoblastes en migrations et dans le mésoderme ventral de la paroi abdominale, bien qu'une expression plus forte soit détectée dans la partie gauche. L'expression dans le maxillaire, la mandibule, le diencephale ventral et la poche de Rathke est aussi homogène (Yoshioka et al., 1998). Chez les souris *iv* et *inv* souffrant de *situs inversus vicerum* (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan

et al., 1998), l'expression de *Pitx2* n'est plus asymétrique, ce qui suggère que *Pitx2* puisse avoir un rôle dans l'asymétrie gauche-droite. De plus, des molécules clefs dans la formation de cet axe comme *Shh*, *nodal*, *lefty1* et *2* induisent l'expression de *Pitx2*, ce qui le place en aval de la cascade de signalisation gauche-droite (Harvey, 1998).

1.2.4.2.2 Inactivation génique

L'ablation génique hétérozygote de *Pitx2* cause à l'occasion une malformation des dents et de l'oeil qui s'apparente à ce qui est retrouvé dans le syndrome de Rieger qu'on retrouve chez l'humain. Des allèles hypomorphiques de *Pitx2* ont été générés par insertion d'une cassette néomycine qui réduit à divers degrés l'expression de *Pitx2*. Les embryons homozygotes pour l'allèle *Pitx2* hypomorphe meurent à partir de e10.5 et peuvent au mieux poursuivre leur développement jusqu'à e18.5, alors que ceux portant l'allèle nul sont résorbés à partir de e9.5 et ne dépassent pas e15. La mort serait causée par des problèmes de malformation cardiaques qui sont complexes et nombreux, entre autres une mauvaise rotation et une absence des valves tricuspides et mitrales. De plus, le poumon souffre d'isomérisme droit, l'estomac est positionné à gauche, les yeux sont mal formés, la paroi abdominale est ouverte, le retournement embryonnaire ne s'effectue pas toujours et le développement de l'hypophyse est écourté (Gage et al., 1999b).

1.2.4.2.3 Redondance transcriptionnelle avec *Pitx1*

Au niveau transcriptionnel, toutes les cibles qui sont transactivées par *Pitx1* en transfection transitoire le sont par *Pitx2* et leurs activités de liaison à l'ADN mesurées par gel retard sont comparables (Drouin et al., 1998a). De plus, les activités synergiques de *Pitx1* avec ses différents partenaires sont aussi reproduites avec *Pitx2* (Tremblay et al., 2000).

1.2.4.3 *Pitx3*

1.2.4.3.1 Profil d'expression

Le gène *Pitx3* humain est muté chez certaines familles atteintes de cataracte et d'ASMD (anterior segment mesenchymal dysgenesis) congénitales

(Semina et al., 1997; Semina et al., 1998). Il est le gène responsable du mutant murin *aphakia* où ces souris sont dépourvues de cristallin. Le gène *aphakia* a été positionné sur le chromosome 19 tout comme *Pitx3*. *Pitx3* est exprimé au moment de la formation du cristallin à partir de e11. *Pitx3* était de prime abord un excellent candidat pour la mutation *aphakia*, mais aucune mutation ne fut identifiée dans la partie codante du gène (Semina et al., 1997). Par contre, le messager *Pitx3* dans ces souris était fortement réduit et dans certains cas même aboli, ce qui suggérait l'implication d'une mutation dans la séquence régulatrice du gène *Pitx3*. Cette piste a mené à l'identification d'une délétion de 652pb à environ 2.5 kb du site d'initiation de la transcription, ce qui explique la diminution importante du messager *Pitx3* (Semina et al., 2000). *Pitx3* est aussi exprimé au niveau des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra*, dans la langue, dans le primordium des incisives, dans les condensations mésenchymateuses au tour du sternum et des vertèbres (Smidt et al., 1997; Semina et al., 1998) et dans tous les muscles squelettiques (communication personnelle Lebel M.). *Pitx3* dans la *substantia nigra* colocalise avec les neurones exprimant la tyrosine hydroxylase, une enzyme essentielle à la génération de dopamine. Ce sont ces mêmes neurones qui sont atteints dans la maladie de Parkinson, suggérant ainsi un rôle pour *Pitx3* dans cette maladie. De fait, l'expression de *Pitx3* est réduite chez les patients atteints de Parkinson. En plus, cette diminution se retrouve également dans un modèle parkinsonien chez le rat généré par microinjection de 6-OHDA (Smidt et al., 1997). Il est important de mentionner que la disparition de *Pitx3* ne prouve pas que ce facteur soit responsable ou même impliqué dans cette maladie. En fait, les souris *aphakias* ne semblent pas atteintes du Parkinson.

I.2.4.3.2 Capacité transcriptionnelle

En transfection transitoire *Pitx3* active le promoteur de la tyrosine hydroxylase qui est au centre de la génération de la dopamine (Lebel et al., 2001). *Pitx3* et *Pitx1/2* lient le même site consensus et leur capacité transcriptionnelle est comparable (Drouin et al., 1998a). Ceci démontre qu'il y a redondance fonctionnelle entre ces facteurs de transcription. Cependant, l'inactivation des gènes respectifs suggère qu'une partie de leurs fonctions soit spécifique à chacun.

I.2.5 Structure des facteurs bHLHs

Les facteurs bHLHs sont caractérisés par un motif protéique basique suivi d'une structure hélicale, puis d'une boucle, et finalement d'une autre structure hélicale. L'ensemble de ces motifs forme le domaine bHLH. Ce domaine est très conservé entre les membres de cette famille, mais à l'extérieur du domaine bHLH la divergence est très grande. La partie basique contenant l'hélice-sonde constitue le domaine de liaison à l'ADN sur des motifs spécifiques (boîte E) et la partie HLH est nécessaire à la formation de dimères. La boucle est de longueur variable allant de huit à vingt-trois acides aminés. Les autres parties du domaine sont constantes : douze acides aminés pour le domaine basique qui débute toujours par une arginine, seize pour la première hélice, et dix-huit pour la seconde. Les facteurs bHLHs peuvent être divisés en trois classes principales ; la classe A qui comprend les facteurs bHLHs à expression ubiquitaire et actifs sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères ; la classe B formée de tous les facteurs bHLHs à expression restreinte et actifs en hétérodimères avec la classe A ; et la classe C qui correspond aux bHLHs répresseurs. La classe C est subdivisée en deux sous-familles : la sous-famille Id qui est dépourvue de domaine basique et qui forme des hétérodimères inactifs avec la classe A, et la seconde qui agit activement de façon négative en liant une séquence d'ADN appelé la boîte N. Les bHLHs sont souvent impliqués dans les processus de détermination et de différenciation cellulaire. Ils sont aussi connus pour leur capacité à changer le destin cellulaire en formant une cascade temporelle de facteurs bHLHs.

I.2.5.1 bHLHs musculaires

I.2.5.1.1 Clonage de *MyoD*

Les facteurs bHLHs les plus étudiés sont les bHLHs myogéniques qui servent de référence aux autres systèmes, notamment pour la neurogénèse et l'hématopoïèse. Le premier bHLH myogénique identifié fut *MyoD* en 1986. L'existence de facteurs critiques pour la myogénèse a été subodorée grâce à des

expériences d'induction des fibroblastes en myocytes, chondrocytes et adipocytes suite à un traitement au 5-azadéoxycytidine (Lassar et al., 1986; Davis et al., 1987; Lassar et al., 1986; Taylor et al., 1979). Cette drogue qui est incorporée dans l'ADN inhibe la méthyltransférase cellulaire, ce qui résulte en une déméthylation des îlots CpG et ainsi dérègle des gènes normalement éteints (Brunk et al., 1996). Des expériences en transfection stable du promoteur déméthylé de l' α -actine cardiaque ont démontré que l'activation de gènes structuraux du sarcomère n'était pas due à l'activation en *cis* de ces gènes, mais plutôt en *trans*. Ainsi, le traitement de ces fibroblastes par cette drogue active le programme myogénique au complet et permet subséquemment l'activation des gènes structuraux sarcomériques (Lassar et al., 1986). Ce programme serait mis en branle par l'activation d'un seul locus à cause de la fréquence élevée de colonies myogéniques obtenues par traitement à l'azadéoxycytidine et à la transformation de ces fibroblastes à une fréquence de 1×10^{-4} par transfection d'ADN déméthylé préparé à partir de C3H10T1/2 traité avec cette drogue. En utilisant une hybridation substractive entre ADNc de myoblastes en prolifération et de l'ARN poly (A+) de fibroblastes C3H10T1/2 en prolifération, des sondes spécifiques aux myoblastes ont pu être préparées, ce qui a permis le criblage d'une librairie d'ADNc de myocyte. Ainsi, plusieurs clones ont été obtenus et trois furent testés à cause de leur profil d'expression restreint aux cellules musculaires, et de leur capacité à transformer des fibroblastes en myocytes. Seul MyoD avait cette capacité de transformation qui correspondait à l'effet d'induction du 5-azadéoxycytidine. D'autres facteurs bHLHs (Myf5, Myogénine, et MRF4) possèdent aussi cette capacité de transformation. (Davis et al., 1987).

1.2.5.1.2 *MyoD*

MyoD est exprimé au niveau du somite et permet la détermination en myoblaste (Sassoon et al., 1989). Cependant, *Myf5* possède aussi cette capacité, en plus d'être exprimé un peu plus précocement que *MyoD* chez la souris (Ontell et al., 1993; Weintraub, 1993). Par contre, leur ordre d'expression est inversé chez le poulet, ce qui suppose une redondance fonctionnelle. *MyoD* marque préférentiellement les muscles hypaxiaux qui donnent le muscle de membres, des

abdominaux, de la langue et du diaphragme, alors que *Myf5* se retrouvent initialement dans la partie épaxiale du somite qui donne les muscles dorsaux et intercostaux. Cependant, cette ségrégation entre *MyoD* et *Myf5* est restreinte temporellement et rapidement les deux facteurs sont coexprimés, du moins jusqu'à ce que *Myf5* s'éteigne et que *MyoD* se retrouve à nouveau seul (Kablar et al., 1997). Par la suite, *Myogénine* apparaît un peu plus tard dans le processus de différenciation et permet la fusion des myocytes en myotubes multinuclés (Wright et al., 1989; Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). Le muscle des membres est un cas particulier du programme musculaire. Ces cellules sont déterminées au niveau du somite par l'expression de *MyoD*, mais celui-ci s'éteint sans qu'aucun autre bHLH myogénique prenne la relève pendant la migration des myoblastes vers les bourgeons des membres (Buckingham, 1994). Cependant, dès l'arrivée de ces cellules dans les bourgeons, *MyoD* réapparaît. La voie de différenciation des myoblastes inclut aussi d'autres facteurs que les bHLHs. Ainsi, *Pax3*, un facteur à homéodomaine de la famille PAIRED, joue un rôle important dans ce processus. Ce facteur se situe en amont des facteurs bHLHs myogéniques et est essentiel à l'activation de l'expression de *MyoD* (Maroto et al., 1997; Tremblay et al., 1998b). Un autre facteur à homéodomaine, *Msx1*, apparaît au cours de la migration des myoblastes dans la zone où l'expression de *MyoD* est réprimée. *Msx1* réprimerait l'activité de *Pax3*, ce qui empêcherait l'activation de *MyoD* spécifiquement durant leur migration (Bendall et al., 1999).

I.2.5.1.3 Ablation génique des facteurs myogéniques

Les ablations géniques de *MyoD*, *Myf5* et *myogénine*, de même que la double inactivation *MyoD* et *Myf5* (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993; Rudnicki et al., 1993; Weintraub, 1993), ont procuré beaucoup d'informations sur l'établissement du programme myogénique. Dans le cas des souris *MyoD*^{-/-} le phénotype est plutôt subtil. La différenciation d'une sous-population musculaire est retardée et le processus de régénération musculaire est moins efficace (Kablar et al., 1997; Rudnicki et al., 1992). Dans le cas des souris *Myf5*^{-/-}, les embryons décèdent à la naissance à cause d'une malformation de la cage thoracique qui bloque la respiration et non pas suite à un problème musculaire (Braun et al.,

1992; Rudnicki et al., 1993). Par contre, l'inactivation génique de *Myogénine* est spectaculaire puisque la myogénèse est bloquée au stade myocytyque. Il suffit cependant de cultiver les myoblastes *Myogénine* *-/-* pour réactiver la capacité de fusion des myocytes qui forment ainsi des myotubes fonctionnels (Nabeshima et al., 1993). Il faut inactiver à la fois *Myf5* et *MyoD* pour bloquer la détermination myoblastique et empêcher la génération de myoblastes (Rudnicki et al., 1993). De fait, l'inactivation d'un seul gène est compensée par la surexpression des autres membres de la famille. Il est intéressant de noter que dans les souris *MyoD* *-/-*, *Myf5* *+/-*, on retrouve une réduction de la masse musculaire, alors que dans le cas *MyoD* *+/-*, *Myf5* *-/-*, le développement musculaire est normal. Ces observations indiquent qu'un seul allèle de *MyoD* peut compenser l'absence de *Myf5*. On peut expliquer ce phénomène de deux façons différentes, qui ne sont d'ailleurs pas mutuellement exclusives: *MyoD* pourrait être moins sensible à la régulation négative du développement musculaire ou être un autoactivateur plus puissant. Ainsi, une seule dose de *MyoD* pourrait déséquilibrer les signaux d'inhibition et déterminer plus efficacement le programme myogénique. Ceci expliquerait aussi pourquoi en culture cellulaire, tous les facteurs bHLHs myogéniques peuvent transformer des fibroblastes en myotubes de façon équivalente : ces signaux d'inhibition seraient absents en culture *in vitro*. Donc, cette famille de facteurs bHLHs permet de mettre en place une cascade génique en haut de laquelle se situerait l'expression des gènes *MyoD* ou *Myf5* qui sont des gènes de détermination myoblastique. L'expression de *MyoD* ou *Myf5* serait alors suivie de celle de *myogénine*, permettant la différenciation terminale des cellules musculaires en myotubes. (Weintraub, 1993; Olson and Klein, 1994; Olson, 1990). Ce mode de fonctionnement en cascade se retrouve aussi dans le système nerveux.

1.2.5.2 bHLHs proneuraux

1.2.5.2.1 achaete-scute et atonal

La drosophile possède un système nerveux central et périphérique. Le système périphérique se divise principalement en deux : les organes sensoriels

externes (OSE) et les organes internes chordotonaux (OCH). Lorsque le complexe *achaete-scute* est inactivé les OSE ne peuvent pas se développer et si l'activité du gène *atonal* est bloquée les OCH ne se forment pas (Hassan and Bellen, 2000). Par contre, si le gène codant pour *Daughterless*, le bHLH ubiquitaire de la drosophile, est défectif tout le développement du système nerveux est affecté, ce qui est en accord avec l'hétérodimérisation des bHLHs proneuraux avec leurs partenaires ubiquitaires (Chien et al., 1996). De plus, la surexpression de ces gènes produit un élargissement du système nerveux de façon autonome au niveau cellulaire, ils sont donc suffisants pour permettre l'induction de la voie neurale (Jarman et al., 1995; Ruiz-Gomez and Ghysen, 1993). Les homologues murins d'*achaete-scute* et *atonals* sont nombreux et aussi impliqués dans le développement du système nerveux, bien que non-restreint à ce système. On peut quand même les séparer en deux sous-familles ; la première, plus près d'*achaete-scute*, et l'autre se rapportant à *atonal*.

1.2.5.2.2 *MASH1* et 2

Les prototypes chez la souris d'*achaete-scute* sont *MASH1* et *MASH2*. *MASH1* est exprimé durant le développement du système nerveux périphérique dans les lignées sympathoadrénales et entériques qui dérivent des cellules de la crête neurale. Il est aussi présent dans certaines régions du système nerveux central et dans les précurseurs intermédiaires des bâtonnets de la rétine de l'oeil. Son expression est transitoire et précède souvent la différenciation neuronale d'à peu près 24 heures (Lo et al., 1991). La surexpression de *MASH1* dans les cellules pluripotentes P19 n'est pas suffisante pour induire la différenciation neuronale, bien que lors de leur différenciation en neurones *MASH1* soit induit (Johnson et al., 1992a). L'ablation génique de *MASH1* est létale à la naissance et semble être due à un problème de respiration et d'alimentation. Le cerveau et la moelle épinières se développent normalement, mais l'épithélium olfactif et les ganglions sympathiques, parasympathiques, et entériques sont sévèrement atteints. Aucune anomalie n'est détectée dans la rétine de l'oeil, à part un retard observé dans la différenciation de ces cellules en culture d'explants rétiens (Guillemot et al., 1993). *MASH2* ressemble beaucoup à *MASH1* (Johnson et al.,

1992b), mais son rôle développemental se situe au niveau de la différenciation des trophoblastes (Guillemot et al., 1995); ainsi, la fonction d'un homologue d'*achaete-scute* est reprise dans un autre contexte que celui du système nerveux.

1.2.5.2.3 *XASH-3*

XASH-3 est un gène proneural de la même famille que *MASH1* et 2, mais contrairement à ceux-ci, il peut changer le destin cellulaire en expérience de gain de fonction. Des injections chez *Xenopus* avec de l'ARN codant pour *XASH3* provoquent une expansion latérale du tube neural. La cause serait la redirection des cellules non-neuronales de l'épiderme présomptif et des cellules de la crête neurale en cellules neuronales. Par contre, l'ectoderme ventral et latéral n'adopte pas ce phénotype neural, probablement dû à des inhibiteurs spécifiques contenus dans cette région, par exemple Notch. Cette expérience de surexpression montrait pour la première fois chez les chordés la transformation en neurone d'autres cellules (Turner and Weintraub, 1994).

1.2.5.2.4 *NeuroD1*

Le premier homologue d'*atonal* chez les mammifères a été cloné simultanément par deux groupes (Naya et al., 1995; Lee et al., 1995). Dans un cas, la méthode du double-hybride classique a été utilisée : l'appât était le domaine bHLH de *daughterless* fusionné au domaine de liaison à l'ADN de LexA, et la banque criblée provenait d'ADNc de cellules souches embryonnaires tumorales (Lee et al., 1995). Dans le second cas : l'appât était le domaine bHLH de E47 (bHLH ubiquitaire) inactif transcriptionnellement et une banque d'ADNc provenant de cellules HIT productrices d'insuline. L'ingéniosité de ce criblage par double hybride modifié fut d'utiliser comme cible la boîte-E spécifique du promoteur de l'insuline, ce qui a eu pour conséquence d'ajouter un coefficient de spécificité au criblage (Naya et al., 1995). De cette façon, ce groupe n'a eu qu'à cribler 500 000 colonies au lieu des 20 000 000 de colonies nécessaires dans la procédure classique ! Ce facteur fut nommé *BETA2* dans le cas de sa provenance de la banque des cellules productrices d'insuline et *NeuroD1* à cause de son expression dans le système nerveux. *BETA2/NeuroD1* est exprimé dans toutes les cellules endocrines du pancréas à partir de e9.5 et il demeure présent jusqu'au

stade adulte. Il est aussi présent dans les cellules entéroendocrines qui produisent la sécrétine et la cholécystokinine (Mutoh et al., 1997), et dans le système nerveux central et périphérique. Son expression dans le système nerveux débute à e9.5 dans les ganglions trigéminaux et à e11.5 dans les ganglions crâniens V jusqu'à XI. Il est aussi exprimé dans une zone restreinte du cortex et de la moelle épinière. Cette zone, appelée le manteau superficiel, contient les cellules neuronales postmitotiques en différenciation terminale. L'expression de *NeuroD1* est transitoire dans le système nerveux et s'éteint vers e14.5, excepté pour quelques endroits comme certains neurones du cerveau et du système olfactif qui expriment continuellement *NeuroD1*. Une surexpression de *NeuroD1* dans des embryons de *Xenopus* cause un élargissement marqué des plaques neurales médiales, intermédiaires et latérales. Cet élargissement est plus grand que lors de la surexpression de *XASH3*, parce que l'ectoderme ventral et latéral est transformé. À ce stade, chaque neurone est entouré d'une cellule non-neuronale et la surexpression de *NeuroD1* transforme ces cellules en neurone (Lee et al., 1995). Donc, *NeuroD1* a la capacité d'échapper aux signaux d'inhibition relayés par Notch. Ceux-ci sont responsables du blocage de la différenciation neuronale et ne peuvent pas être contournés totalement par une surexpression de *XASH3*.

L'inactivation génique de *NeuroD1* a été effectuée par insertion *LacZ* et les souris meurent périnatalement en hyperglycémie et en cétonurie, donc de diabète. Néanmoins, l'injection d'insuline dans ces souris s'est avérée inefficace pour parer au diabète; il serait donc possible qu'il y ait des problèmes concernant les récepteurs de l'insuline. Ces symptômes diabétiques prononcés ont étonné, puisque les cellules productrices d'insuline, de même que toutes les cellules endocrines sont présentes, mais en nombre diminué. Il se pourrait donc qu'il y ait conjointement un problème de sécrétion d'insuline et de réponse au glucose. De plus, les îlots de Langerhans sont malformés, ce qui pourrait aussi ajouter à cet état diabétique. *NeuroD1* n'est pas exprimé dans la glande exocrine du pancréas, bien que celle-ci soit affectée, peut-être à cause de la perte de polarité des cellules acinaires. Les cellules endocrines de l'intestin qui produisent la sécrétine et la cholécystokinine sont absentes des souris dépourvues de *NeuroD1* (Naya et

al., 1997). Des expériences de transfection ont aussi montré que le promoteur de la sécrétine est transactivé par NeuroD1 et qu'il agit de façon synergique avec le cofacteur p300 (Mutoh et al., 1997). Cette synergie implique une interaction physique directe entre ces deux molécules et le domaine bHLH de NeuroD1 serait nécessaire à cette interaction. Une synergie similaire est aussi observée sur le promoteur de l'insuline, mais l'interaction avec p300 se ferait par la partie C-terminale de NeuroD1 (Qiu et al., 1998; Sharma et al., 1999). Les cellules de l'intestin sont quotidiennement renouvelées et lors de ce renouvellement les cellules passent par des zones intestinales spécifiques où ont lieu les étapes respectives de prolifération et de différenciation. NeuroD1 n'est pas exprimé dans la zone proliférative, mais est induit à l'étape de la différenciation terminale. En réinvestiguant les souris NeuroD1^{-/-}, il a été constaté que les cellules intestinales qui produisent la sécrétine montrent une augmentation frappante de leur nombre dans la zone proliférative, puis l'apoptose suivrait dans la partie où la différenciation terminale se produit. De plus, p21 qui est impliqué dans la sortie du cycle cellulaire n'est jamais détecté dans ces circonstances, ce qui expliquerait le blocage de ces cellules en état prolifératif. Cette absence de p21 pourrait mettre en cause l'action directe de NeuroD1 sur le promoteur de p21 (Mutoh et al., 1998; Mutoh et al., 1997). Il est intéressant de noter que MyoD utilise aussi p21 pour mettre fin à la prolifération des cellules musculaires et qu'en absence de p21, l'apoptose est induit (Walsh and Perlman, 1997). Ces souris NeuroD1^{-/-} semblaient ne pas être affectées au niveau du système nerveux, mais des études plus approfondies ont montré que NeuroD1 est en fait essentiel au développement de la couche de cellules granuleuses du dentate gyrus qui est une structure important permettant la formation de l'hypocampe. Ce phénotype serait causé par une prolifération accrue des précurseurs en migration qui se traduirait par un retard dans la différenciation. Pour examiner chez l'adulte les conséquences de cette malformation, des souris transgéniques ont été générées qui récapitulent l'expression de NeuroD1 dans le pancréas grâce au promoteur de l'insuline. Quelques individus peuvent ainsi survivre et dans ces cas, une épilepsie limbique spontanée est observée (Liu et al., 2000; Miyata et al., 1999).

1.2.5.2.5 Cascade de bHLHs proneuraux

NeuroD1 a permis le clonage de nombreux autres facteurs bHLHs apparentés, notamment *neurogénine1* (Ma et al., 1996; Ma et al., 1998a). Celui-ci a la même capacité de transformation en surexpression dans *Xenopus* que *NeuroD1*, mais est placé en amont dans la cascade neurogénique puisqu'il déclenche l'expression de *NeuroD1*. *Neurogénine* serait donc un facteur de détermination et serait l'équivalent de *MyoD* ou *Myf5* dans le muscle. Son patron d'expression correspond aussi à une telle fonction dans la neurogénèse (Olson et al., 1998; Sommer et al., 1996; Ma et al., 1997; Ma et al., 1996). Le développement du système nerveux chez les mammifères est très complexe et la découverte de nombreux autres facteurs bHLHs exprimés dans des types particuliers de neurones à des temps précis complique le résumé de leurs fonctions (Kageyama and Nakanishi, 1997). Un exemple patent de cette action en cascade est le développement des ganglions trigéminaux (Ma et al., 1998b; Ma et al., 1999). *Neurogénine1* est exprimé au début de la formation de la placode trigéminal à e8.25, puis *NeuroD1* apparaît à e8.75 et enfin *NSCL1* à e9.0. Dans l'ablation génique de *neurogénine1*, l'expression de *NeuroD1* et *NSCL1* n'est jamais enclenchée, de même que celle de *Delta1*, le récepteur de *Notch*. Ceci coïncide avec les expériences de surexpression de *Neurogénine* montrant un élargissement du profil d'expression de *NeuroD1* et *Delta1*. Ainsi, durant la neurogénèse, *Neurogénine* seraient placés à l'étape de la détermination cellulaire (Ma et al., 1997), alors que *NeuroD1* auraient plutôt un rôle dans la différenciation terminale. Enfin, *NSCL1* serait important dans le maintien de l'identité cellulaire et serait en quelque sorte l'équivalent de *MRF4* dans le muscle. Cette cascade de bHLHs existe dans le pancréas et place *Neurogénine3* en amont de *NeuroD1*; puisque ce dernier est exprimé chez l'adulte, il serait peut-être le dernier membre de la cascade (Gradwohl et al., 2000). Bien que les facteurs bHLHs myogéniques et proneuraux soient très puissants, ils requièrent la présence de bHLHs à expression ubiquitaire pour être actifs puisqu'ils doivent former des hétérodimères avec ceux-ci.

I.2.5.3 bHLHs à expression ubiquitaires

I.2.5.3.1 *E2A*

Les facteurs bHLHs à expression ubiquitaire ont deux rôles importants : agir comme partenaire pour les bHLHs à expression restreinte et comme transactivateur en homodimère (Hsu et al., 1994; Voronova and Lee, 1994; Ellenberger et al., 1994; Nelson et al., 1990; Henthorn et al., 1990; Hu et al., 1992; Lassar et al., 1991). La famille des bHLHs ubiquitaires comprend le gène *E2A* qui contient 13 exons et qui produit par épissage différentiel deux transcrits différents, E47 (Pan1) et E12 (Pan2). Ceux-ci ne diffèrent que par le domaine bHLH qui peut être généré par deux exons différents. Ces exons sont très différents en N-terminal, mais l'autre partie du domaine bHLH demeure très bien conservée : cinquante et un acides aminés sur soixante et un sont identiques. La partie aminoterminal du domaine bHLH de E12 code pour une région riche en acides aminés acides. Celle-ci formerait une structure défavorisant la liaison à l'ADN d'homodimère E12, mais sans empêcher la liaison d'hétérodimères formés avec la classe B (Sun and Baltimore, 1991).

I.2.5.3.2 Modifications posttraductionnelles

Les modifications posttraductionnelles affectent aussi l'activité et la formation d'homodimères des bHLHs. Par exemple, le potentiel d'oxydoréduction plus élevé dans les lymphocytes B favoriserait la formation d'homodimères E47, qui est l'entité spécifiquement active dans ce type de cellules (Benezra, 1994). La phosphorylation de E47 semble aussi être déterminante, car dans les lymphocytes B, on ne retrouve que la forme hypophosphorylée qui est capable de former des homodimères E47 actifs, la forme hyperphosphorylée étant inapte à lier l'ADN (Sloan et al., 1996).

I.2.5.3.3 Inactivation génique

L'inactivation du gène *E2A* démontre que celui-ci joue un rôle spécifique dans la différenciation des lymphocytes B. Ces souris meurent après la naissance et montrent une absence de lymphocytes B, mais un nombre normal de lymphocytes T, de granulocytes, de macrophages et d'érythroïdes. Les souris hétérozygotes pour l'allèle *E2A* nul ont la moitié du nombre normal de pro-

lymphocytes B et de lymphocytes B matures. Cet effet de dosage suggère un mécanisme de comptage qui suit la quantité de E2A pour produire un nombre proportionnel de lymphocytes B (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1994).

1.2.5.3.4 Interactions protéiques

E2A (et probablement les autres membres de la classe A) est aussi retrouvé dans des interactions synergiques avec d'autres facteurs de transcription. Il peut agir en synergie avec certains facteurs de transcription à domaine Ets comme Erg3, Ets1 et Fli1 sur le promoteur du gène de la chaîne d'immunoglobuline lourde μ , spécifique aux lymphocytes (Rivera et al., 1993; Nelsen et al., 1993). De même, E2A et Pip interagissent synergiquement, mais sur le promoteur du gène de la chaîne d'immunoglobuline légère κ . Pip est un membre de la famille des facteurs de transcription qui répond à l'interféron et il est requis pour la maturation terminale de lymphocytes B et T. Cette interaction physique induirait des changements conformationnels qui augmenterait l'affinité de E47 pour sa cible (Nagulapalli and Atchison, 1998). E2A interagit aussi physiquement avec Lmx1 (Johnson et al., 1997). Celui-ci est un facteur à homéodomaine comprenant deux domaines LIMs qui est exprimé dans les cellules endocrines du pancréas. Il active le promoteur du gène de l'insuline de façon synergique avec E2A. L'interaction physique a lieu entre le domaine LIM2 et le domaine bHLH de E2A. Par contre, la synergie transcriptionnelle requiert les deux domaines LIMs. Ce ne sont pas tous les domaines LIMs qui peuvent interagir avec E2A. Une expérience où les domaines LIMs de Lmx1 sont échangés par les domaines LIMs de Isl1, un autre facteur à homéodomaine exprimé dans le pancréas, empêche l'interaction physique et synergique de se produire (German et al., 1992). Sur ce même promoteur, une synergie transcriptionnelle est observée entre Pdx, un homéodomaine de la famille antenapedia, et l'hétérodimère E2A-NeuroD1. Cette synergie dépendrait d'une double interaction des domaines bHLHs de l'hétérodimère avec l'homéodomaine de Pdx (Ohneda et al., 2000). E2A interagit aussi avec les cofacteurs CBP et P300, ce qui n'est pas à négliger, puisque ces cofacteurs sont souvent recrutés

lors d'interactions transcriptionnelles synergiques (Eckner et al., 1996). Ils sont aussi essentiels entre autres à la différenciation du muscle squelettique et des lymphocytes B (Goodman and Smolik, 2000). Enfin, E47 (Pan1) interagit physiquement avec les facteurs à homéodomaine de la sous-famille Pitx (Poulin et al., 2000). Cette interaction est le sujet du chapitre III de ce travail de thèse.

1.2.5.4 bHLHs répresseurs

Une autre classe de facteurs bHLHs existe qui peut elle-même être divisé en deux parties : les bHLHs répresseurs passifs (Benezra et al., 1990) qui sont dépourvus de leurs domaines basiques, et les bHLHs répresseurs actifs qui lient l'ADN par une boîte-N, une variante de la boîte-E (Kageyama et al., 1995). Dans le premier cas, les facteurs bHLHs qui ne peuvent lier l'ADN forment des hétérodimères avec les bHLHs ubiquitaires, bloquant ainsi la formation d'hétérodimères actifs par compétition (Benezra et al., 1990). En particulier, *Id1* et *Id2* joueraient un rôle dans la génération des lymphocytes B et dans la neurogénèse en bloquant l'action du gène *E2A* et des gènes proneuraux, respectivement. La répression de l'expression de *Id1* et *Id2* permettrait aux autres bHLHs de devenir actifs (Neuman et al., 1993; Saisanit and Sun, 1997). Les facteurs bHLHs à répression active sont aussi nombreux. La famille des facteurs *HESs* est importantes dans le développement du système nerveux. Les facteurs *HESs* sont les homologues murins des complexes *Hairy and Enhancer of Split* chez la drosophile (Sasai et al., 1992). Ces facteurs sont des cibles déréprimés par Notch. Ceux-ci vont ensuite réprimer l'expression des bHLHs proneuraux comme *atonal* et *AS-C* en coopération avec *Groucho* qui à son tour recrute une activité histone-déacétylase. L'interaction entre *Groucho* et *Hairy and Enhancer of Split* se fait par un domaine WRPW conservé chez tous les membres de ces bHLHs à répression active (Paroush et al., 1994; Dawson et al., 1995).

I.3. Transcription du gène POMC

I.3.1 Hypophyse

L'hypophyse est un organe glandulaire situé à la base du cerveau sous l'hypothalamus et qui repose sur un os plat appelé la selle turcique. Elle fait partie de l'axe hypothalamus-hypophyse qui forme le lien entre le système nerveux et le système endocrinien. L'hypophyse est formée de trois lobes : postérieur, antérieur et intermédiaire (fig. I.3). Le lobe postérieur produit l'ocytocine et la vasopressine alors que le lobe intermédiaire sécrète l' α -MSH. Le lobe antérieur, d'un intérêt tout particulier en ce qui concerne mon travail, est constitué de cinq types de cellules endocrines ; les cellules corticotropes qui produisent l'ACTH et représentent 10% des cellules du lobe antérieur ; les gonadotropes produisant la FSH β et la LH β et représentant 20% ; les somatotropes, la GH, 50% ; les lactotropes, la PRL, 10% ; et les thyrotropes, la TSH β , 10%. La TSH β , la FSH β et la LH β sont actives sous forme de dimères constitués d'une sous-unité commune qui est la sous-unité α (α -GSU) (Jacobson and Drouin, 1994; Horvath and Kovacs, 1994). Du point de vue développemental, les hormones apparaissent de façon séquentielle à mesure que l'hypophyse se développe (fig I.3). La première hormone à apparaître est l'ACTH à e12.5, puis la α -MSH à e14.5. Par contre, l' α -GSU devance d'environ deux jours l'ACTH, mais celle-ci n'est pas active sans la partie β qui forme le dimère actif. Trois sous-unités β sont sécrétées par l'hypophyse la FSH, la LH et la TSH qui vont être exprimées aux alentours de e15. Les cellules qui produisent la GH et la PRL apparaissent aussi à ce moment (Japon et al., 1994). Ces hormones sont un outil précieux et efficace pour l'étude de l'expression des gènes et de la différenciation cellulaire puisqu'elles sont abondantes, restreintes à chaque type cellulaire et marquent l'état d'avancement de la différenciation cellulaire.

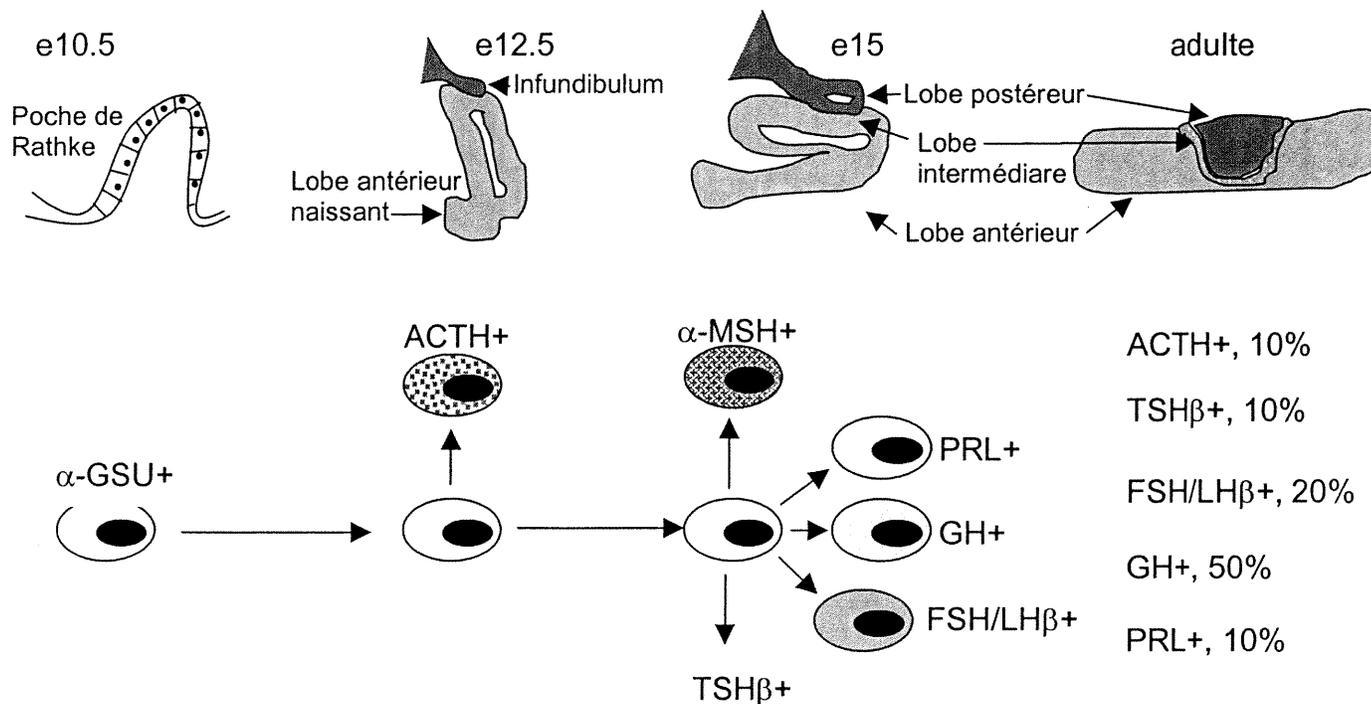


Figure I.3 Représentation schématique du développement de l'hypophyse, de la différenciation des cellules hypophysaires, et de leurs proportions approximatives chez la souris mâle adulte.

I.3.2 Les lignées POMC de l'hypophyse : les cellules corticotropes et AtT-20, ainsi que les mélanotropes

Deux lignées cellulaires de l'hypophyse expriment la prohormone POMC. À partir de la POMC, les cellules corticotropes produisent l'ACTH, alors que les cellules mélanotropes produisent l' α -MSH (Eipper and Mains, 1980). Des enzymes spécialisées appelées les convertases clivent la POMC pour générer soit

l'ACTH ou l' α -MSH. La PC1 est une de ces convertases qui est présente à la fois dans le lobe antérieur et le lobe postérieur. Elle a pour fonction de générer l'ACTH qui est un peptide de 39 acides aminés. Par contre, les cellules mélanotropes possèdent en plus la convertase PC2 qui fera subir à l'ACTH un second clivage qui produira l' α -MSH qui elle ne fait que 13 acides aminés (Seidah et al., 1991; Marcinkiewicz et al., 1993). Les cellules corticotropes sont les premières cellules pleinement différenciées à apparaître au cours du développement hypophysaire selon le critère de l'expression de l'ACTH qui survient aux environs de e12.5 (Chatelain et al., 1979; Lugo et al., 1989; Watanabe and Daikoku, 1979). La cellule corticotrope est caractérisée du point de vue transcriptionnel par les mécanismes qui régulent l'expression de la POMC soit au cours de la différenciation cellulaire ou en réponse aux signaux hormonaux. L'initiation de la transcription de la POMC dans les cellules corticotropes repose sur un mécanisme synergique propre à ces cellules (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993). Ce mécanisme implique plusieurs facteurs à expression restreinte : le facteur bHLH NeuroD1 (Poulin et al., 1997), Pitx1 qui est un facteur à homéodomaine (Lamonerie et al., 1996), et Tpit, un facteur à boîteT (Lamolet et al., 2001). Les cellules mélanotropes expriment Pitx1 et Tpit, mais sont dépourvues de NeuroD1. Ainsi, dans l'hypophyse, NeuroD1 est un marqueur spécifique des cellules corticotropes. La sécrétion d'ACTH est stimulée par la CRH. Pour permettre la réponse à ce signal, les cellules corticotropes expriment le récepteur à CRH qui peut aussi servir de marqueur spécifique pour ces cellules. Les cellules mélanotropes répondent aussi aux signaux qui proviennent de l'hypothalamus (dopamine), mais l'effet observé est une diminution de la sécrétion de l' α -MSH. La sécrétion d'ACTH est aussi régulée de façon négative, mais par le récepteur des glucocorticoïdes (voir récepteur des glucocorticoïdes) et cette régulation est spécifique aux cellules corticotropes.

L'expression de ces facteurs de transcription et l'ensemble des propriétés décrites ci-dessus caractérisent moléculairement ce qu'est une cellule corticotrope. Ces caractéristiques sont présentes dans une lignée cellulaire

transformée appelée AtT-20. Celles-ci ont été établies en culture à partir d'une tumeur hypophysaire prélevée sur une souris exposée à un rayonnement atomique (Atomic Test-20), d'où le nom AtT-20 (Gumbiner and Kelly, 1982). Ces cellules que l'on considère comme corticotropiques nous sont donc très utiles comme modèle *in vitro*.

I.3.3 Promoteur POMC

Le promoteur POMC est situé en amont de la partie codante du gène. Des expériences de transgénèse chez la souris ont démontré que la région comprise entre -480 et +63 pb confère une spécificité d'expression dans les cellules corticotropes et mélanotropes (Jacobson and Drouin, 1994). Le promoteur POMC est divisé en quatre domaines : distal (-480,-323pb), central (-323,-166pb), proximal (-166,-34pb) et minimal (-34,+63pb). L'activité transcriptionnelle de chacun de ces domaines a été vérifiée en expérience de transfection dans les cellules AtT-20. Lorsque les domaines proximal et distal sont placés séparément en amont du promoteur minimal de POMC l'activité transcriptionnelle est augmentée de 5 à 10 fois. Par contre, lorsque le domaine distal est juxtaposé au promoteur minimal, l'activité transcriptionnelle est alors peu augmentée. Par la suite, des expériences de combinaison de chacun de ces domaines ont montré que l'activité transcriptionnel du domaine distal associé avec le domaine central était synergique. Cet effet n'est pas observé pour aucune autre combinaison des domaines du promoteur POMC. De plus, cet effet synergique des domaines distal et central est spécifique aux cellules AtT-20, puisque la synergie ne peut pas être observée dans d'autres contextes cellulaires, notamment dans d'autres lignées d'origine hypophysaire. À cause de cette propriété de synergie spécifique aux cellules corticotropes, les domaines distal et central ont été au centre des études sur la transcription du gène POMC. Des expériences de protection contre la DnaseI ont montré quatre empruntes dans le domaine distal qui ont été dénommé DE1, DE2, DE3 et DE4 (Therrien and Drouin, 1991). La région la plus intéressante s'est avérée être DE2, puisque cette région à elle seule peut récapituler l'activité synergique de tout le domaine distal (avec le domaine central). Dans cette région

DE2, il existe trois sites putatifs pour la liaison de facteurs de transcription. Une région riche en séquence AT (DE2A), et deux autres ressemblant à des boîtesE (DE2B et DE2C). L'analyse par mutagenèse de ces sites a montré que la synergie corticotropique nécessite l'élément DE2C, mais que les sites en amont renforce cette synergie. Les boîtesE sont normalement liées par des facteurs bHLHs. Ces facteurs étant souvent impliqués dans la différenciation cellulaire, il devenait intéressant d'identifier s'il s'agissait bien de ce genre de facteur qui était associé à l'activité du site DE2C. Ainsi, des essais de retardement sur gel ont montré que l'activité qui liait le site DE2C était un facteur bHLH et que celle-ci était restreinte aux cellules AtT-20 (Therrien and Drouin, 1993). Bien que l'identité du ou des facteurs en question n'était pas connue, cette découverte allait être fondamentale pour la poursuite de mon projet.

Cette synergie implique aussi le domaine central et des analyses de mutagenèse de ce domaine ont permis de cerner un site critique pour l'activité transcriptionnelle du promoteur POMC. Ce site, CE3, lorsque muté provoque une baisse de l'activité transcriptionnelle en expérience de transfection dans les cellules AtT-20 d'environ 90%. Ce même site est aussi nécessaire à l'activité synergique observée en combinaison avec la boîteE DE2C. Le facteur permettant l'activation du site CE3 a été cloné dans le laboratoire par criblage d'une librairie d'expression et a été nommé *Pitx1* (Lamonerie et al., 1996). Le site CE3 contient aussi une séquence en amont du site *Pitx1* qui est similaire au site de liaison de brachyury (T). Le facteur liant ce site à aussi été identifié dans le laboratoire et il fait partie de la famille des facteurs à boîteT. Son patron d'expression étant restreint à l'hypophyse, il fut baptisé *Tpit*. Celui-ci agirait comme partenaire de *Pitx1* sur le promoteur de POMC et les deux facteurs, *Pitx1* et *Tpit*, sont essentiels pour l'activité transcriptionnelle d'un rapporteur contenant l'élément CE3 (Lamolet et al., 2001). Étant donné l'importance de la région CE3 dans la synergie spécifique aux cellules corticotropes, on peut penser que les sites DE2C, *Pitx1* et *Tpit* forment la base moléculaire qui permettrait l'expression histospécifique du gène POMC dans les cellules corticotropes.

Bien que la boîte E_{neuro} (DE2C) et que le site CE3 (Pitx1 et Tpit) soient critiques pour la pleine activité du promoteur POMC, d'autres éléments reconnus par d'autres facteurs de transcription sont aussi impliqués (Therrien and Drouin, 1991). En particulier, le facteur NGFI-B (un récepteur nucléaire orphelin) agit sur un élément contigu à la boîte- E_{neuro} ; cet élément (DE2A et B, NurRE), bien que non-essentiel à la synergie entre la boîte E_{neuro} et le site Pitx1, rehausse fortement son activité (Therrien and Drouin, 1993). De plus, NGFI-B est impliqué dans la réponse au CRH qui régule de façon positive la transcription du gène POMC dans les cellules corticotropes (Drouin et al., 1998b). Enfin, GR, un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires, est impliqué dans la répression transcriptionnelle du promoteur POMC par son action sur deux éléments différents: le premier (NurRE) est le même que celui lié par NGFI-B, et le second, le nGRE, est plus proximal (Philips et al., 1997; Drouin, 1993). Au NurRE, il pourrait y avoir compétition pour un coactivateur commun entre NGFI-B et GR (Martens et al., 2000), et au nGRE, un trimère de GR s'associerait au DNA pour causer une répression active (Drouin et al., 1993). On distingue donc deux types d'activités transcriptionnelles du promoteur POMC : une activité spécifique et synergique qui confère l'histospécificité à l'expression du gène POMC, et des activités de régulation positive et négative qui modulent le niveau d'expression de POMC dans les cellules corticotropes différenciées.

I.4. Développement hypophysaire

L'hypophyse est formée à partir de deux structures embryonnaires différentes qui donnent la neurohypophyse et l'adénohypophyse (Schwind, 1928). Des expériences chez *Buffo japonicus* et des greffes de la caille au poulet ont démontré que l'adénohypophyse provient du bourrelet neural antérieur (BNA) (Kawamura and Kikuyama, 1992; Kikuyama et al., 1993; Couly and Le Douarin, 1985; Couly and Le Douarin, 1987). Juxtaposé caudalement au BNA, on retrouve une région qui donnera naissance successivement à l'hypothalamus et à

l'infundibulum. Ce dernier formera le futur lobe postérieur hypophysaire (fig. 1.4). À ce stade, (e6.5 chez la souris) le mouvement des cellules de cette région est très difficile à suivre chez les mammifères, c'est pourquoi le modèle amphibien est d'une grande utilité pour déterminer comment les cellules du BNA arrivent à former la poche de Rathke, le primordium de l'hypophyse. Chez *Buffo japonicus* où l'on greffe le BNA de type sauvage à un spécimen albinos, on peut bien suivre la migration de la masse cellulaire qui deviendra l'hypophyse. On constate que celle-ci migre caudalement sous le cerveau supérieur en ligne médiane et va contacter l'intestin primitif en son extrémité rostrale. Ces événements se passent à un temps équivalent à e7.5 chez la souris. Par la suite, cette masse cellulaire vient en contact avec le diencéphale ventral, tout en maintenant un lien avec l'intestin primitif par son extrémité rostrale (~e8.5). À e9.5, l'infundibulum apparaît et vient en contact avec la poche de Rathke rudimentaire. À e10.5, ce rudiment prend sa place dans la cavité cervicale pour former la véritable poche de Rathke. Puis, la poche se referme et le contact avec la cavité buccale est perdu (~e12.5) (Kawamura and Kikuyama, 1998) (fig. 1.4). Néanmoins, la formation très précoce de la poche de Rathke peut être envisagée d'une autre façon en invoquant une invagination de l'ectoderme oral (Schwind, 1928). En fait, ces deux points de vue ne sont pas en complète contradiction. En effet, dans ces deux cas les cellules donnant naissance à la poche de Rathke proviennent quand même du BNA et il y a toujours contact de ces cellules avec l'intestin primitif rostral. De plus, l'induction par le diencéphale ventral à e8.5 est toujours présente, et la séquence d'apparition des hormones est conservée. La seule différence entre les deux visions réside dans le trajet qu'empruntent ces cellules pour se rendre au point de contact avec l'intestin primitif. Ceci pourrait d'ailleurs très bien s'expliquer par la différence d'espèce où ont eu lieu ces études développementales.

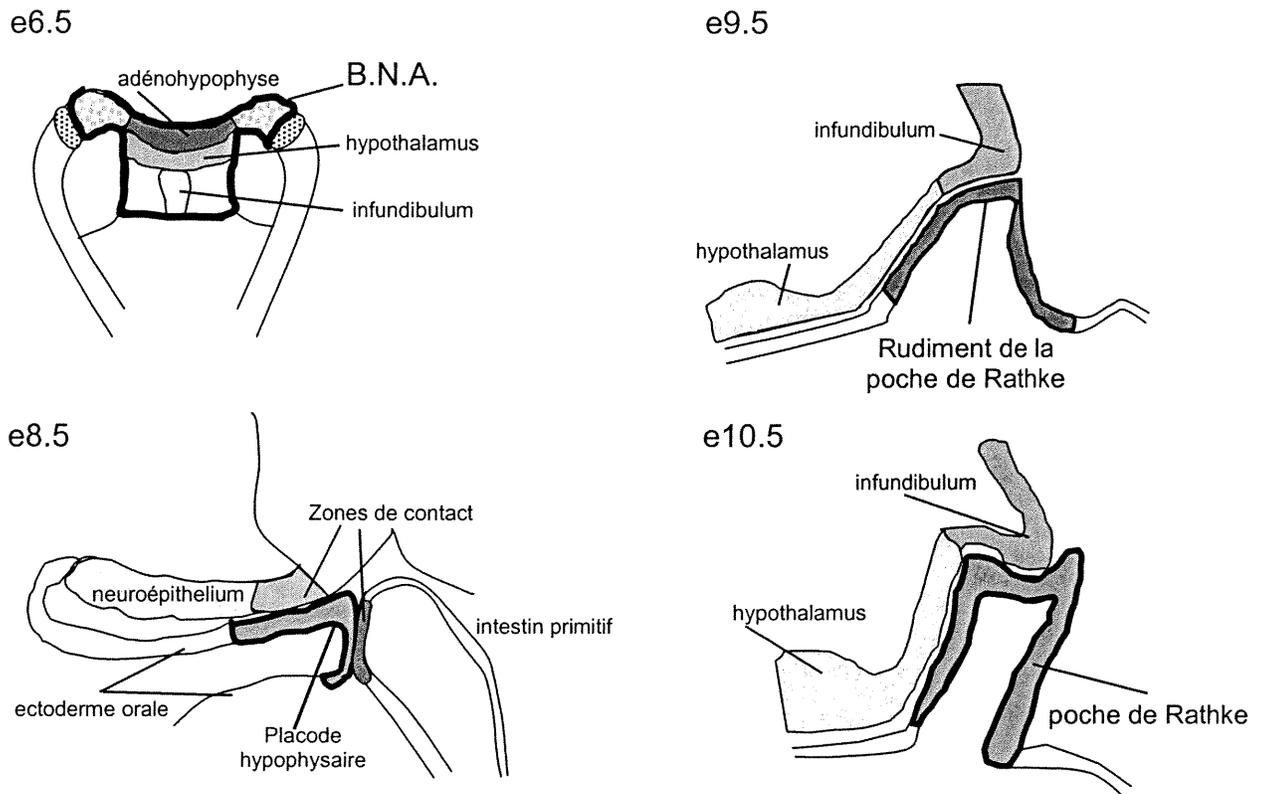


Figure 1.4 Développement hypophysaire Délimitation chez le poulet du bourelet neural antérieur (B.N.A.) d'où émane l'hypophyse à un stade développemental équivalent à e6.5 chez la souris. À e.8.5, la placode hypophysaire établit deux points de contact inductifs entre le diencephale ventral et l'intestin primitif supérieur. À 9.5, le contact avec l'intestin primitif n'existe plus, mais il y a contact avec l'infundibulum. La placode hypophysaire forme maintenant le rudiment de la poche de Rathke. À e10.5, le rudiment de la poche de Rathke migre dans la cavité cervicale et la poche de Rathke est formée. Le contact inductif avec l'infundibulum est maintenu.

I.5. Signalisation hypophysaire au cours du développement

I.5.1 Apparition des molécules de signalisation

Le développement hypophysaire est divisé en trois étapes : très précoce (e6.5 à e8.5), précoce (e8.5 à e11.5) et tardif (e11.5 à l'adulte). Le premier signal inductif entre la masse cellulaire hypophysaire et une autre structure se ferait vers e7.5 lors du contact entre les futures cellules hypophysaires et l'intestin primitif supérieur. Des expériences chez les amphibiens ont montré que l'inhibition du contact hypophysaire avec l'intestin primitif supérieur par une membrane de plastique bloque le développement de l'hypophyse. De même, des greffes de poche de Rathke avec ou sans intestin primitif supérieur démontre la nécessité d'un signal émanant de cet endoderme (Kawamura and Kikuyama, 1998). La deuxième vague de signalisation survient au jour e8.5 lorsque la masse de cellules hypophysaires entre en contact avec le diencephale ventral. Cette étape a été investiguée assez exhaustivement par deux groupes qui y ont découvert l'expression d'une molécule appartenant à la famille TGF β , BMP4. Cette molécule est présente à e8.5 dans le diencephale ventral et ces groupes rapportent ne pas y avoir trouvé l'expression d'autres molécules réputées pour une activité inductrice. Un peu plus tard, à e9.5, l'infundibulum est bien distinctif et *Fgf8* y débute son expression. À mesure que l'expression de *Fgf8* augmente, celle de *BMP4* diminue, pour finalement disparaître à e12.5. Par contre, une autre source de BMP apparaît à e11.5 dans la partie ventrale de la poche de Rathke et qui se distribue à e12.5 dans toute l'hypophyse, et dans le mésenchyme ventral. L'expression de *Shh* a également été étudiée durant le développement hypophysaire puisque chez la drosophile *hh* initie l'expression de *Dpp* (de la famille TGF β) dans les cellules antérieures adjacentes. *Shh* est exprimé uniformément dans l'ectoderme oral et complètement absent de la poche de Rathke. D'autres molécules impliquées dans les processus d'induction ont été

étudiées. Notamment l'expression de *Wnt5a* qui est présent dans le diencéphale ventral. Cette expression est cependant un peu plus tardive que celle de *BMP4*. En effet, l'expression de *Wnt5a* ne débute qu'à partir de e10.5, mais elle reste ensuite soutenue durant le développement hypophysaire. *Wnt4* est aussi exprimé, mais dans l'hypophyse elle-même à partir de e10.5 (Treier et al., 1998; Ericson et al., 1998). La voie de signalisation Notch est aussi présente dans l'hypophyse. On y retrouve l'expression du récepteur *Notch2* et du ligand *serrate1*, ce dernier formant un gradient ventro-dorsal à e11.5 (Souazé F., communication personnelle).

I.5.2 BMP4

BMP4 est un facteur de croissance qui fait partie de la famille TGF β et de la sous-famille BMP2 qui inclut Dpp. L'activité BMP est associée à la ventralisation ou à la formation de l'épiderme (Sasai and De Robertis, 1997). Des facteurs sécrétés comme Noggin et Chordin inhibent cette activité et permettent la dorsalisation ou la formation de l'ectoderme. Tous les membres de la famille TGF β sont synthétisés à partir d'un précurseur et un clivage permet leurs sécrétions dans le milieu intercellulaire. Par contre, la forme sécrétée demeure inactive due à la liaison non-covalente du propeptide TGF β (appelé LAP). Ainsi, pour obtenir une forme active, le LAP est obligatoirement dégradé. Cependant, le mécanisme de cette dégradation est encore mal défini. La forme bioactive finale est un dimère maintenu par des liens hydrophobes et des interactions bisulfures. Les homodimères BMP4 lient leurs récepteurs (BMPR) par coopération. Ces récepteurs BMP sont des sérine-thréonine kinases et il en existe deux types appelés type I et type II. Suivant la liaison de l'homodimère BMP4 à ces récepteurs, le BMPR-II s'autophosphoryle et phosphoryle le BMPR-I, ce qui provoque la formation d'un hétérotétramère où BMPR-I active par phosphorylation les facteurs SMADs. Ceux-ci sont par la suite transportés au noyau, puis vont se lier spécifiquement à des séquences d'ADN pour réguler l'expression de gènes

cibles (Massague, 1998; Massague and Wotton, 2000; Capdevila and Belmonte, 1999).

Plusieurs expériences de transgénèse ont été effectuées par le groupe de Rosenfeld pour étudier la pertinence de ces molécules signalisatrices dans l'hypophyse. Une première souris transgénique bloque le signal BMP4 précoce à e8.5 par surexpression de Noggin à l'aide du promoteur Pitx1. Ce promoteur permet une expression de la protéine placée sous son contrôle dans l'ectoderme oral dès la formation de la poche de Rathke. Ces souris ont été analysées à e17.5 et leur hypophyse est bloquée au stade de la poche de Rathke. En effet, celle-ci se retrouve formée d'un seul feuillet épithélial. De façon surprenante, seule l'ACTH est exprimée. Ceci indique que le signal menant à la différenciation corticotrope ne dépend pas de BMP4 à e8.5, mais que celui-ci est primordial pour l'obtention des autres lignées hypophysaires et pour la morphogénèse de l'hypophyse. Pour bloquer le signal BMP2 plus tardif (e11.5), un récepteur dominant négatif (BMPRIIA) de BMP fut exprimé ectopiquement à l'aide du promoteur α -GSU, qui débute son expression hypophysaire à e10.5. Ces hypophyses adultes expriment l'ACTH, la α -GSU et la LH β , par contre une énorme baisse des cellules dépendantes de Pit1 est observée, ce qui donne une phénotypie des souris naines Ames dwarf. Ce résultat est surprenant, puisque des expériences d'explants à partir de poche de Rathke à e10.5 démontrent un besoin en BMP pour la différenciation des cellules α -GSU. Donc, la différenciation des cellules gonadotropes est supposée dépendre de la signalisation BMP. L'explication des auteurs est que la forte expression ventrale de BMPs n'est pas en fait bloquée complètement par le dominant négatif. De plus, étant donné la proximité physique des gonadotropes de cette source, celles-ci peuvent poursuivre leur processus de différenciation. Par contre, ce besoin en BMP semble transitoire, car BMP2 et 4 sont exprimés transitoirement et des expériences d'explants *in vitro* à partir de poche de Rathke plus développée (e11.5) démontre que ces molécules peuvent avoir l'effet inverse et inhiber la différenciation des cellules α -GSU. En accord avec cet aspect temporel, une expérience de transgénèse utilisant le promoteur α -

GSU pour maintenir une expression élevée de BMP4 dans toute l'hypophyse démontre que la différenciation terminale de tous les types cellulaires est réprimée, à la seule exception des cellules corticotropes qui résistent. Ces expériences démontrent l'indépendance des cellules corticotropes vis-à-vis de BMP et la nécessité de ce signal à un temps défini et à une concentration donnée pour les autres types cellulaires (Treier et al., 1998; Ericson et al., 1998; Norlin et al., 2000).

1.5.3 Fgf8

Fgf8 fait partie d'une famille de facteurs mitogènes qui comprend au-delà de vingt membres. Les Fgfs ont des effets pléiotropiques avec entre autres des activités prolifératives, neurotrophiques et angiogéniques. Leurs actions passent par l'activation de récepteurs à Fgfs qui sont des récepteurs à tyrosine kinase. On en retrouve quatre types qui subissent de l'épissage différentiel pour produire toute une panoplie de récepteurs de surface spécifiques à certains types cellulaires. Les Fgfs sont des ligands monomériques et suites à leur liaison aux récepteurs, ces derniers homo ou hétérodimérisent, ce qui permet une phosphorylation entre tyrosines des récepteurs et ainsi leurs activations. La liaison de ligand requiert aussi la présence de protéoglycans qui sont attachés à la membrane cellulaire ou à la matrice extracellulaire. Ces protéines qui possèdent des résidus glycosaminoglycans sont chargées négativement et présenteraient le Fgf monomérique en unité répétitive, ce qui faciliterait la dimérisation des récepteurs. La partie intracellulaire des récepteurs à Fgf interagit avec des domaines SH2 qui reconnaissent spécifiquement des phosphotyrosines, ce qui permet de recruter de nombreuses molécules adaptatrices qui amènent des substrats aux récepteurs pour activer spécifiquement certaines voies de transduction des signaux. Par exemple, FGFR-1 actif s'associe à PLC γ qui est à son tour phosphorylé sur une tyrosine. PLC γ , alors actif, mène à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate en inositol 1,4,5 triphosphate et diacylglycérol. L'inositol 1,4,5 triphosphate augmente la libération du Ca $^{2+}$

intracellulaire et le diacylglycérol augmente l'accumulation de la forme active de la PKC. La famille des Src kinases, Grb2, PI3-K, SHP-2, FAK, Crk, Nck, Shb et FRS2 pourraient aussi s'associer aux récepteurs FGFRs et activer les voies de transduction de RAS et des MAP kinases. Force est de constater que la signalisation intracellulaire déclenchée par les Fgfs est très complexe (Klint and Claesson-Welsh, 1999; Johnson and Williams, 1993).

Le rôle de Fgf8 dans l'induction hypophysaire a été étudié par des expériences de transgénèse où Fgf8 est sous le contrôle du promoteur α -GSU. Le phénotype est surprenant puisqu'on a noté une augmentation du nombre de corticotropes et l'absence des autres types cellulaires avec une perturbation frappante de la morphologie hypophysaire, celle-ci ressemblant à plusieurs poches de Rathke accolées les unes aux autres. Ce résultat semble aller à l'encontre des expériences d'explants *in vitro* qui montrent que Fgf8 (ou l'infundibulum qui est une source de Fgf) restreint le domaine d'expression corticotropique. Ces observations peuvent être réconciliées si l'on prend en considération que Fgf8 est sous contrôle du promoteur α -GSU et que la source de Fgf8 se tarit avec la disparition des cellules α -GSU. Il faudrait une analyse temporelle plus poussée que celle publiée à un seul temps, soit e17.5. Dans ce cas, on pourrait prédire que tôt, les cellules corticotropes seraient absentes, et qu'elles apparaîtraient plus tardivement que normalement. Ce résultat n'implique pas nécessairement que Fgf8 soit un signal important pour la différenciation corticotropique. D'ailleurs, des cultures d'explants de poches de Rathke prélevées à e9.5 où il n'y a pas d'expression de Fgf8, montrent que les cellules corticotropes peuvent se différencier sans ce signal. Par contre, l'infundibulum en coculture adjacente avec des poches de Rathke de même que des billes enveloppées de Fgf8 peuvent inhiber l'expression d'ACTH. D'autres expériences d'explants de poches de Rathke ont montré qu'il est possible d'accroître le nombre de cellules corticotropes en bloquant la source de Fgfs par traitement au SU5402, une drogue qui inhibe spécifiquement l'activité tyrosine kinase des récepteurs à Fgf. De cette façon, près de l'infundibulum on retrouve les cellules thyrotropes, somatotropes et

lactotropes qui sont les cellules dorsales dépendantes de *Pit1*. Puis de façon ventrale, on retrouve les cellules gonadotropes et corticotropes. Les cellules corticotropes ne peuvent se différencier que loin de la source de Fgfs que produit l'infundibulum, alors que les cellules *Pit1*-dépendantes s'établissent plus près de cette source, mais ne se différencient totalement que lorsque cette source de Fgfs diminue considérablement, soit vers e15. Donc, Fgf8 pourrait être impliqué dans l'établissement de l'axe dorsoventral hypophysaire tout comme BMP (Treier et al., 1998; Ericson et al., 1998; Norlin et al., 2000).

1.5.4 Shh

Hh fut identifié chez la drosophile par criblage génétique et *Shh* est un de ses homologues murins. Shh est une molécule sécrétée impliquée dans le positionnement cellulaire, notamment durant l'établissement de l'axe antéropostérieur des membres, dans la ventralisation du système nerveux central, dans l'arborisation pulmonaire et dans les muscles dorsaux des membres. Shh possède un peptide signal, une activité cholestérol transférase et une capacité d'autoprotéolyse. L'autoprotéolyse produit un fragment actif en N-terminal, mais aucune activité n'est associée à la partie C-terminale qui diffuse dans l'espace extracellulaire. Une molécule de cholestérol est ajoutée à la partie aminotermine lors de l'autoprotéolyse par une attaque nucléophile du lien thioester qui a été précédemment formé entre la glycine₂₅₇ et la cystéine₂₅₈. Grâce à la molécule de cholestérol attachée au fragment actif, Shh se retrouve ancré à la membrane cytoplasmique. L'action morphogénique de Shh s'effectue via un récepteur à douze domaines transmembranaires dénommé Patched (Ptc). En absence de Shh, Ptc est retrouvé en association avec Smoothened (Smo) et cette association bloque l'activité de Smo (Chen and Struhl, 1998). À la suite de la liaison de Shh à Ptc, ce dernier libère Smo qui enclenche alors la signalisation intracellulaire. Smo est un récepteur de la famille Frizzled (récepteurs pour Wnt) à sept domaines transmembranaires et possède une activité couplée aux protéines G (Hammerschmidt et al., 1997; Christian, 2000). Les effecteurs nucléaires de cette voie de transduction sont des facteurs de transcription à cinq doigts de zinc qui

sont au nombre de trois chez les mammifères, soient : *Gli1*, 2 et 3. L'homologue de ces facteurs chez la drosophile est *cubitus interruptus (Ci)* et celui-ci peut induire l'expression de *Decapentaplegic (Dpp)*, *Wingless (Wg)* et *Ptc* ; il semblerait que chez les mammifères cette capacité soit conservée (Alexandre et al., 1996; Goodrich et al., 1996).

L'inactivation génique conjointe des facteurs *Gli1* et *Gli2* empêche le développement hypophysaire puisqu'à e11.5 on ne peut détecter de poche de Rathke (Park et al., 2000). Par contre, on ne peut savoir si cet effet est dû au développement anormal du diencephale ventral qui est essentiel à l'induction hypophysaire ou à l'absence de *Shh* dans l'ectoderme oral. Il existe un homologue *Gli2* chez le poisson zèbre nommé *yto (youtoo)* et un mutant à action négative dominante, *yto^{ty119}* (Karlstrom et al., 1999). Il est connu que la poche de Rathke normale exprime, de façon transitoire, un marqueur très précoce du cristallin, la δ -cristalline. Le mutant *yto^{ty119}* montre une transdifférenciation de l'hypophyse en cristallin selon plusieurs critères : son allure générale, sa structure épithéliale et fibreuse, et l'expression de marqueurs plus tardifs comme β et γ -cristalline. Ce phénotype, bien que très différent de l'ablation génique de *Gli2*, suggère que *Shh* dirige la placode hypophysaire vers un destin hypophysaire, et que l'absence de signalisation *Shh* laisse dériver la placode hypophysaire vers le destin du cristallin (Kondoh et al., 2000). L'effet différent de ce mutant par rapport à l'inactivation génique des facteurs *Glis* pourrait être dû à un effet temporel puisque l'action négative dominante du mutant *yto^{ty119}* ne peut se produire qu'au moment où *yto* est normalement exprimé. Des expériences en transgénèse ont aussi été effectuées pour valider la fonction de *Shh* lors du développement hypophysaire. *Hip* (huntingtin interacting protein) qui est un récepteur qui antagonise l'activité *Shh* a été surexprimé dans tout l'ectoderme oral grâce au promoteur *Pitx1*. Cette expression ectopique mène à une hypoplasie hypophysaire. Un autre indice que *Shh* joue un rôle dans le développement hypophysaire est l'effet de son expression ectopique sous le contrôle du promoteur α -GSU. Le phénotype

hypophysaire obtenu est une hyperplasie causée par une expansion des cellules gonadotropes et thyrotropes. Ces cellules, à un certain stade de leur différenciation, requièrent une activité BMP et cette expression ectopique de Shh induit *BMP2*, ce qui explique l'effet observé (fig 1.5) (Treier et al., 2001).

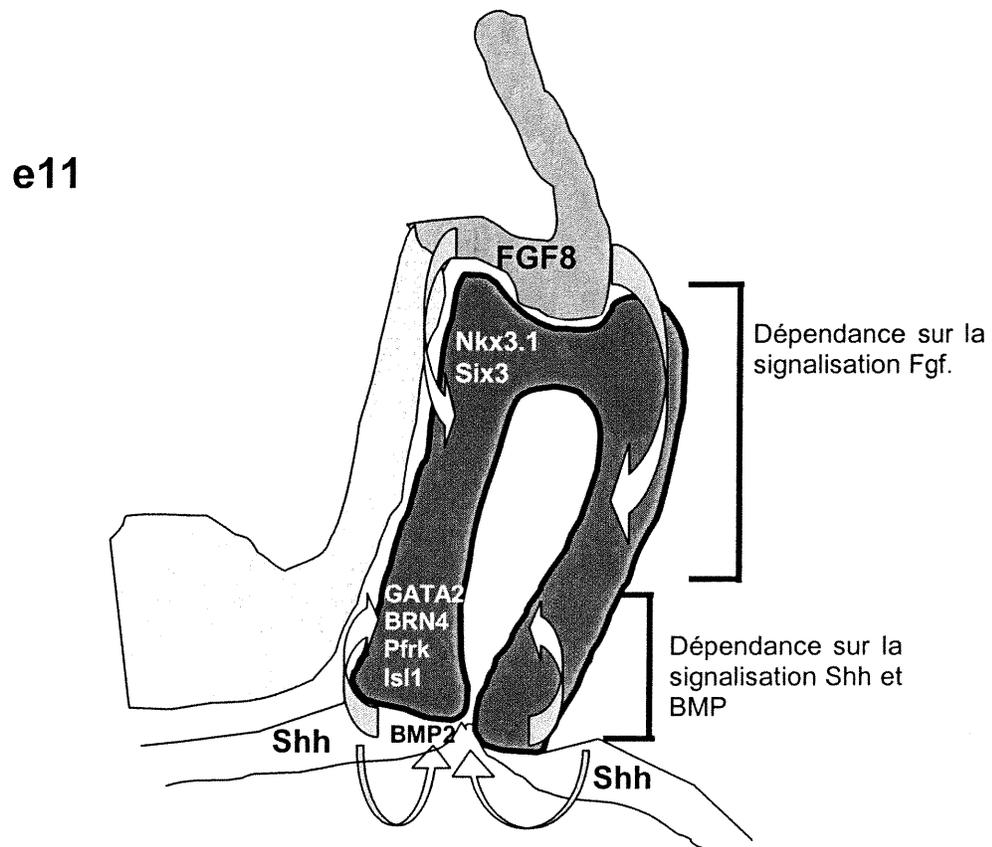


Figure I.5 Modèle d'antagonisme des signaux de positionnement cellulaire et de prolifération entre *Fgf8* et *Shh/Bmp2* à e11. *Shh* est présent dans l'ectoderme oral et induit *Bmp2*. L'induction de *Bmp2* est concomitante à l'expression de *Fgf8* dans l'infundibulum et cela produirait deux gradients morphogéniques opposés qui détermineraient des zones d'identité différente dans l'axe dorsoventral.

1.5.5 Wnt4

Wnt4 est également un membre d'une très nombreuse famille de molécules de signalisation qui sont glycosylées et sécrétées. Ces protéines font environ 400 acides aminés avec plusieurs sites de glycosylation et un motif conservé de 24 cystéines. Le premier membre de cette famille, *int-1*, a été cloné chez la souris en 1982, puis un homologue chez la drosophile fut identifié cinq ans plus tard, *Wg* : la désignation *Wnt* provient de *Wg* et *Int*. Ces glycoprotéines sont critiques dans le développement embryonnaire ; elles sont impliquées dans différents processus cellulaires comme l'établissement de l'axe dorsoventral des bourgeons des membres, la transition mesenchymateuse-épithéliale du rein, la détermination de certains neuroblastes, la segmentation de l'embryon de drosophile et enfin la polarisation qui produit l'endoderme et le mésoderme chez *C. elegans*. Le modèle prévalant de la voie de signalisation Wnt passe par l'activation de Frizzled (Fz), un récepteur à sept domaines transmembrannaires. Celui-ci contient une extension en N-terminal qui lie le ligand et en C-terminal un motif SXV qui interagit avec les domaines PDZ, permettant une interaction avec dishevelled. Cette voie de signalisation est constitutivement inactive due à l'activité de la protéine kinase zest-white (zw) qui maintient le complexe armadillo-APC sous une forme hyperphosphorylée provoquant leurs dégradation par ubiquitination. Lorsque Wnt stimule le récepteur Fz, celui-ci active dishevelled. Ce dernier est une phosphoprotéine qui bloque directement ou indirectement l'activité de zw. Cela a pour effet l'accumulation de forme plus stable de armadillo-APC qui s'associe avec des facteurs de transcription de la famille HMG. Ce complexe est alors transporté au noyau et permet l'activation spécifique de certains gènes, notamment Engrailed chez la drosophile (Bellaïche and Perrimon, 1997; Arias et al., 1999).

Il est vraisemblable que cette voie de signalisation soit utilisée lors du développement hypophysaire où l'on retrouve l'expression des gènes *Wnt5a* et *Wnt4*. Ce dernier semble très important pour la différenciation hypophysaire tardive, puisque son inactivation génique abolit l'expression hormonale des

cellules gonadotropes, somatotropes, lactotropes et thyrotropes. Seules les cellules corticotropes se différencient complètement. Ceci suggère que l'absence de *Wnt4* inhibe particulièrement la différenciation terminale des autres types de cellules, puisque la quantité de cellules hypophysaires est quasi normale et que la morphologie hypophysaire est peu affectée (Treier et al., 1998).

I.5.6 Notch

I.5.6.1 Structure de la protéine

Notch a été découvert en 1919 chez la drosophile grâce à une mutation haploinsuffisante qui a pour effet de produire des entailles au niveau de la marge de l'aile, d'où le nom de Notch. Une perte de fonction totale de *Notch* produit un phénotype neurogénique. Ce phénotype consiste en une transformation des cellules normalement destinées à l'épiderme en neurones. Notch est une protéine membranaire à passage unique. Sa partie extracellulaire consiste en trente-six répétitions du domaine EGF et trois répétitions d'un domaine conservé riche en cystéines ; le domaine intracellulaire comprend 6 répétitions de domaine Ankirine placé en tandem et une séquence PEST. Le récepteur Notch est clivé au niveau du trans-golgi par une convertase apparentée à la furine. Ensuite, il est présenté à la surface cellulaire sous forme d'un hétérodimère entre ses parties amino et carboxyterminales. Les ligands du récepteur Notch sont aussi des molécules transmembranaires à passage unique : chez la drosophile, ce sont Serrate et Delta. Ces récepteurs contiennent des répétitions du domaine EGF et un motif riche en cystéine nommé DSL pour Delta-Serrate-Lag2. La partie intracellulaire de ces ligands n'est pas conservée entre eux et le remplacement de cette partie par la β -galactosidase n'a pas de conséquence détectable. Parce que le ligand est ancré dans la membrane, son action est limitée aux cellules adjacentes (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Robey, 1997) (Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1993; Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1993).

1.5.6.2 Notch le récepteur

Des expériences de mosaïques génétiques chez *C. elegans* ont montré que *Notch* (*Lin-12*) agit comme récepteur de façon autonome au niveau cellulaire, alors que *Delta* (*LAG-2*) est le ligand et agit de façon non-autonome. Cette démonstration fut faite par l'étude du développement vulvaire. La vulve, chez *C. elegans*, provient de deux cellules à potentiel équivalent appelées Z1.ppp et Z4.aaa. L'ablation par laser de l'une ou l'autre de ces cellules donne invariablement une cellule d'ancrage vulvaire (AV). Normalement, suivant l'apparition d'une cellule AV, celle-ci signale à sa voisine de ne pas emprunter le même destin, mais plutôt de devenir une cellule précurseur utérine ventrale (VU). En absence de *LIN-12* (*Notch*), Z1.ppp et Z4.aaa deviennent toutes deux des cellules AVs, alors qu'en présence d'une activité constitutive de *LIN-12* ces cellules deviennent deux cellules VUs. L'interprétation de ces résultats ne permettait pas de définir si *LIN-12* est le récepteur ou le ligand. Le but des analyses génétiques des mosaïques était de déterminer si la cellule dépourvue génotypiquement de l'activité *LIN-12* présentait un phénotype ou non. Dans le cas où la cellule déficiente en *LIN-12* conserve un phénotype sauvage et que la cellule sauvage présente un phénotype mutant, on parle de mécanisme cellulaire non-autonome. Alors que dans le cas inverse, si on détecte un phénotype mutant uniquement dans les cellules où l'ablation génique de *LIN-12* est effective, on parle d'un mécanisme cellulaire autonome. Si *LIN-12* est cellule autonome, on croira que celui-ci est impliqué dans la réception du signal. À la suite de l'analyse méticuleuse de plus de trois mille cinq cents mosaïques, la réponse fut convaincante, *LIN-12* est cellule autonome et donc impliqué dans la réception du signal. D'autres expériences de mosaïque chez la drosophile vont encore plus loin en postulant non seulement que Notch est un récepteur, mais que celui-ci agit comme inhibiteur. Dans ce cas, l'activation de Notch empêche le destin cellulaire de se diriger vers la voie neuroblastique, suggérant ainsi que la voie par défaut est celle de l'épiderme (Seydoux and Greenwald, 1989; Heitzler and Simpson, 1991).

I.5.6.3 Modulation de l'activité Notch

L'activation de Notch chez la drosophile est modulée par une glycosyltransférase, Fringe, qui modifie Notch pour favoriser son interaction avec Delta et inhiber celle avec Serrate. Cette modulation permet l'établissement très précis d'une frontière entre la partie dorsale et ventrale de l'aile de drosophile (Fortini, 2000).

I.5.6.4 Activation de Notch

La toute première activation de Notch est un événement stochastique. À la suite de cette activation par son ligand, il y a clivage de Notch, puis une translocation au noyau où celui-ci interagira avec Suppressor of Hairless. Ceci a pour effet de déréguler la transcription du locus de *Hairy and Enhancer of Split*. Ce locus code pour des facteurs bHLHs répresseurs qui agissent entre autres sur le promoteur de *achaete-scute* et empêchent ainsi l'action des facteurs bHLHs proneuraux. En conséquence, l'expression de *Delta* se retrouve fortement diminuée, ce qui empêche l'activation de *Notch* sur la cellule voisine. De cette façon, cette cellule qui exprime *Notch* sera l'unique cellule à devenir ectodermique, puisque les gènes proneuraux y sont absents (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1993).

I.5.6.5 Notch chez les vertébrés

La signalisation Notch est conservée chez les vertébrés et de nombreux rôles lui sont attribués, notamment dans la myogénèse, la neurogénèse et la différenciation des cellules endocrines du pancréas. L'hypophyse exprime au cours du développement *Notch2* et le ligand *Serrate*, il est donc plausible que ce mécanisme de signalisation soit impliqué dans la différenciation de cellules hypophysaires (Weinmaster et al., 1991; Weinmaster et al., 1992; Lindsell et al., 1996)(Souazé F., communication personnelle).

I.6. Facteurs de transcription hypophysaire

Le développement hypophysaire est séparé en trois parties : très précoce, précoce et tardive. Le patron d'expression de certains facteurs de transcription exprimés dans l'hypophyse correspond à une ou plusieurs de ces étapes, ce qui aide à leur attribuer un rôle dans la morphogenèse de l'hypophyse ou dans la différenciation cellulaire.

Plusieurs facteurs de transcription suivent un gradient d'expression dorsoventral. Le facteur le plus ventral identifié jusqu'à ce jour est P-Frk qui fait partie de la famille des forkheads. Il apparaît à e10.5 dans la partie ventrale de la poche de Rathke et devient restreint dans la partie rostro-ventrale de l'hypophyse. *Brn4*, de la famille des homéodomaines POU, apparaît à e10.5 et est restreint ventralement. De même que *Isl-1*, qui est distribué uniformément à e10, mais qui devient restreint ventralement à partir de e11.5. Dorsalement, il y a *Nkx3.1* qui est restreint tout au long du développement à ce segment et *Six3* qui est uniformément exprimé au tout début du développement hypophysaire, mais qui devient aussi restreint dorsalement vers e12.5 (Treier et al., 1998; Kioussi et al., 1999a). Ces facteurs possèdent un patron d'expression qui suit un gradient dorsoventral et qui serait formé par Fgf et BMP (fig I.5).

I.6.1 Développement très précoce (e6.5 à e8.5)

I.6.1.1 Rpx

Rpx est un facteur à homéodomaine de la famille paired qui est exprimé à e7 dans le mesendoderme antérieur, puis activé à e7.5 dans la plaque céphalique qui inclut le BNA. Un peu plus tard, à e8.5, Rpx disparaît du mésendoderme et on le retrouve dans une région très limitée de l'ectoderme oral et dans l'endoderme de l'intestin rostral, juste au point de contact entre ces deux structures. Ce point

de contact est très important dans l'induction de la formation de la poche de Rathke. À e9, son expression devient spécifique à la poche de Rathke. Par la suite, à e11.5, son expression est à son plus fort, puis à e13.5 il y a disparition du transcrit suivant l'axe ventrodorsal, jusqu'à sa disparition complète à e15.5 (Hermesz et al., 1996). Il est intéressant de noter que ce patron d'extinction de *Rpx* est l'inverse de l'expression de *Pit1* qui apparaît à e13.5 dans la partie ventrale en s'étendant dorsalement (Treier et al., 1998). *Rpx* possède un domaine répresseur similaire à celui de *En* chez la drosophile : de plus, il a été montré que *Rpx* inhibe l'activité de *Prop-1* (qui est épistatique à *Pit1*) par hétérodimérisation (Sornson et al., 1996). Ainsi, *Rpx* pourrait bloquer l'expression de *Pit1* par ce mécanisme. Les souris déficientes en *Rpx* présentent différents degrés de sévérité d'un phénotype hypophysaire qui va de l'absence de la poche de Rathke, jusqu'à une dysmorphogénèse de l'hypophyse. L'absence d'hypophyse pourrait être attribuée à l'absence d'infundibulum qui est essentiel à l'induction de l'adénohypophyse (Dattani et al., 1998).

I.6.1.2 Pitx1

Pitx1 apparaît à e8.25 dans le stomodeum, juste après le repliement du tube neural, aucun signal n'ayant pu être observé dans le BNA, tant chez la souris que chez le poulet. Tout comme *Rpx*, *Pitx1* est exprimé dans l'intestin rostral ; ceci suggère que *Pitx1* puisse être impliqué dans ce tout premier signal inductif qui permet l'établissement de la poche de Rathke (Lanctôt et al., 1997). Par contre, *Pitx1* est un peu plus tardif que *Rpx* et *Six3*. *Pitx1* est exprimé dans l'hypophyse chez l'adulte, mais à des niveaux différents selon la lignée cellulaire ; les cellules gonadotropes et thyrotropes sont celles qui l'expriment le plus abondamment (Lanctôt et al., 1999b). Les événements précoces du développement hypophysaire semblent normaux dans les souris *Pitx1* *-/-* : exclusion de *Shh* de la poche de Rathke, expression de *BMP2*, *Fgf8*, α -GSU, *Lhx3*, *Pit1*, *Prop-1* et *Isl-1* sont identiques aux souris normales. Par contre, l'expression au stade P0 (post-natal) de la *FSH β* , la *LH β* et la *TSH β* est diminuée, contrairement à l'expression de

l'ACTH qui est augmenté (Szeto et al., 1999). L'absence de *Pitx1* n'empêche pas la différenciation cellulaire, mais cause probablement un problème de prolifération des cellules gonadotropes et thyrotropes qui sont celles qui expriment plus fortement *Pitx1*.

I.6.1.3 Pitx2

Il existe trois isoformes de *Pitx2* (Schweickert et al., 2000), soient : *Pitx2a*, *2b* et *2c*. *Pitx2a* et *2b* utilisent un promoteur commun situé en amont de la partie codante. La différence entre ces isoformes provient d'un épissage différentiel de l'exon 3. Ces deux isoformes ne diffèrent que par leurs extrémités N-terminales et sont exprimés dans toutes les lignées cellulaires de l'adénohypophyse, excepté peut-être dans les cellules corticotropes. L'isoforme *2c* utilise un promoteur dans l'intron 3 et possède une extrémité N-terminale différente des autres isoformes en utilisant l'exon 1c. L'effet de l'ablation de *Pitx2* sur le développement hypophysaire est drastique comparé à celle de *Pitx1*. Dans les embryons *Pitx2* *-/-*, il y a formation de la poche de Rathke, mais celle-ci ne prolifère pas pour produire une hypophyse complète (Gage et al., 1999b). Ce phénotype est très semblable à celui de la délétion homozygote de *Lhx4* et hétérozygote *Lhx3* ou à celui de l'homozygote *Lhx3* *-/-* (Sheng et al., 1996; Sharma et al., 1998). Chez les souris *Pitx2* *-/-*, l'expression initiale de α -GSU a lieu et les cellules corticotropes sont présentes, mais en nombre réduit. Par contre, il n'y a pas expression de la TSH β et les autres lignées dépendantes de *Pit1* sont absentes. Tous les facteurs morphogéniques (Fgf, BMP, Shh) et les facteurs de transcription qui répondraient à ces facteurs sécrétés (HNF3 β , Nkx3.1, Prop1 et GATA2) sont présents, bien que leurs patrons d'expression soient quelque peu affectés par l'absence de prolifération de la poche de Rathke (Lin et al., 1999). *Pitx1* et *Pitx2* ont un patron d'expression très semblable au niveau de l'hypophyse et il n'a pas été déterminé si un des deux facteurs précède l'autre dans son expression. *Pitx1* est toujours exprimé dans les hypophysés *Pitx2* *-/-* : la fonction hypophysaire précoce de *Pitx2* n'est donc pas redondante avec celle de *Pitx1* (Lin et al., 1999). Par contre, il se

pourrait que d'autres fonctions plus tardives (différenciation ou prolifération de lignées cellulaires hypophysaires) ou très précoces (formation du rudiment de la poche de Rathke) soient partagées.

I.6.2 Développement précoce (e8.5 à e11.5)

I.6.2.1 Lhx3 et 4

Lhx3 et 4 sont des facteurs à homéodomaine de la famille des LIMs (Sheng et al., 1996; Sharma et al., 1998; Tremblay et al., 1998a). Ces deux facteurs apparaissent à e9 dans toute la poche de Rathke, mais à e12.5 l'expression de *Lhx4* se restreint au au domaine du futur lobe antérieur, alors que *Lhx3* est aussi exprimé dans le domaine du future lobe intermédiaire. Par contre, à e15.5 l'expression de *Lhx4* diminue, mais celle de *Lhx3* demeure élevée et cette différence de niveau d'expression est maintenue au stade adulte. L'inactivation de ces gènes a un effet drastique sur le développement hypophysaire. L'analyse des embryons de *Lhx3* *-/-* montre que la poche de Rathke se développe, mais ne peut pas croître et les auteurs constatent que toutes les lignées hypophysaires sont absentes à l'exception de la lignée corticotropique, bien que celle-ci soit réduite en nombre. *Rpx* est exprimé dans ces embryons à e10.5, mais s'éteint à e12.5. Ceci suggère que l'étape initiale de l'induction de la poche de Rathke a eu lieu et que *Lhx3* est requis pour le maintien de l'expression de *Rpx*. Les embryons *Lhx4* *-/-* sont moins affectés, puisqu'une adénohypophyse est formé, par contre celle-ci est hypoplastique et possède une augmentation du diamètre de sa lumière due à un problème de prolifération cellulaire des cinq lignées cellulaires qui sont tout de même présentes. Il est à noter que le lobe intermédiaire n'est pas affecté. La double inactivation de ces deux gènes bloque la formation de la poche de Rathke. Bien qu'un rudiment soit présent, la poche ne migre pas dans sa cavité cervicale. Par contre, la présence d'un allèle de type sauvage d'un ou de l'autre de ces gènes permet la formation d'une poche de Rathke complète. Cependant, dans le cas où il y a présence d'un allèle *Lhx3*, une structure hypophysaire est présente et les marqueurs α -GSU, Pit1, GH, POMC et TSH β sont exprimés. Il semble que

Lhx3 soit nécessaire pour dépasser le stade de la formation d'une poche de Rathke complète, alors que *Lhx4* est nécessaire à l'expansion des lignées hypophysaires.

1.6.2.2 Pax6

Pax-6 est un facteur de transcription qui possède un homéodomaine de la famille paired et un domaine paired (Dahl et al., 1997). Son expression dans l'hypophyse à e9.5 est complémentaire à *Shh*, c'est-à-dire restreinte à la poche de Rathke. De plus, son expression est plus forte dans la partie dorsale de la poche qui elle est plus éloignée de la source de *Shh*. Pax6 est aussi transitoire puisqu'à e17.5 son messenger disparaît. L'ablation génique de *Pax6* montre que la formation de la placode oculaire ne se produit pas, que les neurones hypothalamiques produisant la GnRH sont absents, que certaines structures du cerveau supérieur sont manquantes et que les cellules α du pancréas sécrétant le glucagon demeurent indifférenciées. Dans la moelle épinière et le cerveau inférieur *Pax6* contrôle l'identité des neurones moteurs et des neurones intermédiaires ventraux par l'intégration du signal *Shh*. L'absence de *Pax6* a pour effet de déplacer la frontière ventrodorsal de l'hypophyse vers la partie dorsale. Ceci donne une expansion de l'expression des cellules α -GSU positives (gonadotropes et thyrotropes) et une diminution des cellules somatolactotropes (Kioussi et al., 1999b). Donc, *Pax6* aurait un rôle de patterning en établissant la frontière ventrodorsale, mais n'aurait aucun rôle quant à la différenciation des cellules hypophysaires.

1.6.2.3 Prop1

Prop1 a été identifié par clonage positionnel comme étant le gène muté *df* dans les souris Ames Dwarf (*Df*) (Sornson et al., 1996). Cette mutation cause la disparition quasi totale des lignées cellulaires Pit1-dépendantes et du même coup suggère fortement que *Pit1* soit épistatique à *df*. Il a aussi été démontré que *df* est autonome au niveau cellulaire par production de chimère où seules les cellules *dfl/df* sont dépourvues de Pit1 (Gage et al., 1996). *Prop1* est un facteur de

transcription à homéodomaine de la famille paired. Il est spécifique à l'hypophyse et débute son expression à e10 pour atteindre son maximum à e12.5, puis son expression diminue pour devenir plutôt faible à P0. Il semble que *Pit1* serait une cible de *Prop1*, puisque le promoteur *Pit1* contient une séquence qui est activée en cotransfection par *Prop1*. Par contre le promoteur complet de *Pit1* ne répond pas à *Prop1*. Il est intéressant de noter la répression de l'activité *Prop1* sur cette cible multimerisée par *Rpx* et l'interaction de *Rpx* avec N-CoR qui recrute des déacétylases. Il est donc plausible que *Rpx* inhibe *Prop1* et que lors de la disparition selon l'axe ventrodorsal de *Rpx*, *Prop1* active *Pit1*. Ceci produirait le patron d'expression *Pit1* suivant cet axe ventrodorsal (Sornson et al., 1996). Des mutations de *Prop1* ont été identifiées chez l'homme. Trois types de mutations se retrouvent dans l'homéodomaine ; une première qui arrête la synthèse protéique après la seconde hélice ; une seconde qui change la phénylalanine 117 en isoleucine dans la troisième hélice ; et enfin l'arginine 120 en cystéine, aussi dans la troisième hélice. Ces mutations empêchent la transactivation d'une cible de *Prop1* et montrent une activité très réduite de liaison à l'ADN. Fait étonnant, ces patients ne produisent pas de FSH β et LH β . Ceci est en accord avec les souris *df* qui montrent une diminution des gonadotrophines. Comme il n'y a pas de *Pit1* dans les cellules gonadotropes et que ce phénotype n'est pas restauré par injection de GnRH, ce problème de différenciation n'est pas secondaire à l'absence de *Pit1*, mais probablement dû à un défaut intrinsèque aux cellules gonadotropes (Wu et al., 1998).

I.6.2.4 GATA2 et BMP

Les facteurs de transcription connus qui sont exprimés dans l'hypophyse au cours du développement sont maintenant plus nombreux qu'il y a quelques années. Malgré ce nombre de facteurs, très peu peuvent se rapporter à l'apparition des molécules de signalisation hypophysaire. Il est possible que *GATA2* soit contrôlé par *BMP*, puisqu'une souris transgénique qui surexprime *BMP4* sous le contrôle du promoteur α -GSU montre une augmentation de l'expression de *GATA2*. Vu que *BMP2* est la source ventrale de *BMP* et que le

type cellulaire le plus ventral est gonadotrope, les cellules GATA2 positives seraient leurs précurseurs. Lors de la surexpression de GATA2 par le promoteur Pit1, les marqueurs des cellules gonadotropes comme *Isl-1* et *SF-1* élargissent leurs patrons d'expression. De façon surprenante, cette transgénique qui surexprime GATA2 et qui mène à une augmentation spectaculaire des cellules gonadotropes, le fait au détriment des cellules somatotropes et thyrotropes. Le moment où la surexpression est produite est important. Ainsi, l'expression ectopique de GATA2 sous le contrôle du promoteur GH n'a pas d'effet, cette expression étant ciblée trop tardivement. Aussi, l'utilisation du promoteur Pit1 qui possède deux enhanceurs, un précoce (e13.5) et un tardif (e16.5), ne montre un effet qu'en présence de l'enhancer précoce. Cette surexpression de GATA2 restreint le profil d'expression *Pit1*, ce qui expliquerait la diminution du nombre de cellules thyrotropes. Ainsi, un mutant dominant négatif de GATA2 exprimé sous le contrôle du promoteur α -GSU mène à la disparition des cellules gonadotropes. Par contre, en contradiction apparente, ces transgéniques montrent une diminution marquée des cellules thyrotropes avec une expansion du domaine d'expression de *Pit1*. Pour réconcilier cette divergence, les auteurs attribuent à GATA2 un rôle prépondérant dans la différenciation des cellules gonadotropes et des thyrotropes. La dépendance des cellules thyrotropes sur deux facteurs soit GATA2 et Pit1 est supportée par la transgénique surexprimant Pit1 sous contrôle du promoteur α -GSU, puisque les cellules gonadotropes sont transformées en thyrotropes sans perte de l'expression GATA2. Alors, ces deux facteurs semblent critiques pour la différenciation des cellules somatotropes (Pit1 positives), les cellules thyrotropes (Pit1 et GATA2 positives) et les cellules gonadotropes (GATA2 positives). Ce qui devient spectaculaire dans ce modèle est la modulation de l'activité GATA2 par interaction physique avec Pit1. Dans les cellules gonadotropes, Pit1 bloque l'activation par GATA2 des marqueurs gonadotropiques comme *SF1*. Par contre, dans les cellules thyrotropes, il y a interaction synergique entre Pit1 et GATA2 sur le promoteur TSH β . Donc, la conversion des cellules gonadotropes en cellules thyrotropes par *Pit1* se ferait en deux temps.

Premièrement, en antagonisant l'activité GATA2 sur des promoteurs gonadotropes spécifiques (LH β et SF1) qui, elle, dépend de l'interaction physique directe de ces facteurs. Puis, grâce au synergisme de ces mêmes facteurs sur le promoteur TSH β qui dépend de l'activité de liaison à l'ADN de Pit1 (Dasen et al., 1999).

I.6.3 Développement tardif (e11.5 à l'adulte)

I.6.3.1 Pit1

Pit1 est un des facteurs de transcription hypophysaire les plus étudiés. Il fut cloné en 1988 en utilisant une librairie d'expression et un site de liaison retrouvé dans les promoteurs GH et PRL (Ingraham et al., 1988). Pit1 fait environ 33kDa et contient un homéodomaine POU, de même qu'un autre domaine conservé, le domaine POU. Lors de la découverte de *Pit1*, on soutenait que le transcrit se retrouvait seulement dans les cellules somatotropes, lactotropes et thyrotropes, mais ces mêmes auteurs ont par la suite défendue la thèse d'un transcrit pan-hypophysaire et d'une restriction de la traduction aux trois types cellulaires énumérés ci-dessus. Un transcrit a aussi été détecté dans le tube neural, mais jamais de protéine (Simmons et al., 1990). La protéine Pit1 est présente à partir de e15.5 dans l'hypophyse. Étant donné la présence de Pit1 dans les cellules somatotropes, les souris naines ont été analysées pour la présence de mutations dans le gène *Pit1*. Ainsi, la souris Snell Dwarf (*dw*) a une mutation ponctuelle à l'intérieure du domaine POU de Pit1 qui change un tryptophane en cystéine. Cette mutation bloque la capacité de Pit1 de lier son site sur l'ADN. La souris Dwarf Jackson (*dw^j*) montre une insertion d'un fragment d'ADN dans la séquence codante de *Pit1* (Li et al., 1990). L'expression de *Pit1* dans ces mutants fut analysée par hybridation in situ et immunohistochimie. Ces expériences montrent que Pit1 est absent chez *dw* et très réduit chez *dw^j*. L'absence du transcrit Pit1 s'expliquerait par une boucle d'autorégulation de *Pit1* dans le cas des souris *dw* et *dw^j* (Li et al., 1990).

Pit1 est requis pour la régulation de GH, PRL et de son propre gène (Crenshaw III et al., 1989; Simmons et al., 1990). L'EGF, l'AMPc et les esters de phorbol régulent l'expression de ces gènes par l'intermédiaire de sites *Pit1* dans ces promoteurs et ces substances sont connues pour activer des voies spécifiques de protéines kinases (Kapiloff et al., 1991). Des marquages métaboliques ont montré que *Pit1* est une phosphoprotéine. La ou les kinases qui phosphoryl(ent) *Pit1 in vivo* n'est (ne sont pas) connue(s), mais PKA et PKC peuvent phosphoryler la thréonine 220 de l'homéodomaine qui est phosphorylé *in vivo*. La forme phosphorylée de *Pit1* augmente l'homodimérisation, ce qui a pour conséquence d'augmenter ou de diminuer l'affinité de liaison à certains sites des promoteurs GH, PRL et *Pit1*. Ainsi, l'état de phosphorylation de *Pit1* est important dans la détermination de sa spécificité fonctionnelle, si on se fie aux résultats obtenus *in vitro* (Kapiloff et al., 1991). Par contre, des expériences en transfection utilisant des mutants *Pit1* montrent clairement que celui-ci n'a pas besoin d'être phosphorylé pour médier l'action de EGF, AMPc ou forskolin (Okimura et al., 1994). Quelque 5 ans plus tard, une explication de la régulation de l'activité de *Pit1* par la voie PKA nous revient, cette fois-ci via CBP et le recrutement d'histones acétylases comme P/CAF. Dans ce cas, on postule que *Pit1* interagit avec N-CoR pour être maintenu dans un état inactif par recrutement du complexe répresseur Sin3 qui contient une activité déacétylase (Xu et al., 1998). Ceci ressemble étrangement à ce qui est observé pour les récepteurs nucléaires ER, RAR et TR. Une mutation ponctuelle vient renforcer cette hypothèse de corépresseur, puisque le remplacement de l'acide glutamique 254 par une alanine produit un mutant *Pit1* inactif transcriptionnellement qui lie toujours l'ADN et qui a plus d'affinité pour interagir directement avec N-CoR que la molécule sauvage. Si cela est vrai, on devrait observer une diminution de l'effet synergique CBP-*Pit1*, mais on a pas été aussi loin dans la vérification de l'activité d'un mutant si intéressant. *Pit1* interagit aussi synergiquement avec d'autres facteurs de transcription (Simmons et al., 1990); ER lorsqu'activé par son ligand sur le promoteur de la PRL (Crenshaw III et al., 1989); ZN-15 qui est un facteur à doigts de zinc sur le promoteur GH (Lipkin et al., 1993); Ets-1 lorsqu'activé par la voie

RAS (Bradford et al., 1995); Lhx3 sur les promoteurs TSH β , PRL et Pit1 (Bach et al., 1995; Bach et al., 1997); et Pitx1 sur les promoteurs PRL et GH (Tremblay et al., 1998a; Szeto et al., 1996). Pit1 est un facteur extrêmement important pour la différenciation des cellules somatotropes, lactotropes et thyrotropes, mais il n'agit pas seul. Il est certain que chacun de ces types cellulaires doit être spécifié par un code combinatoire, ce qui donne un certain sens à ces nombreuses interactions avec différentes familles de facteurs de transcription.

I.6.3.2 SF1

SF1 fait partie d'une famille de facteurs de transcription appelée les récepteurs nucléaires hormonaux, ceux-ci sont les effecteurs de divers ligands comme les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, la vitamine D et les rétinoïdes. Cependant, SF1 est un membre orphelin de cette famille, puisqu'il n'y a pas de ligand identifié à ce jour qui module son activité. *SF1* est impliqué dans la régulation histo-spécifique des gènes impliqués dans la biosynthèse des hormones stéroïdienne (Lala et al., 1992; Ikeda et al., 1993; Parker and Schimmer, 1997). Sa structure est similaire à tous les autres récepteurs nucléaires et consiste principalement en deux doigts de zinc placés en N-terminal. Ce domaine de liaison à l'ADN contient une boîte P impliquée dans l'interaction avec l'ADN et une boîte D qui sert d'interface de dimérisation. Adjacente à cette boîte, on retrouve la boîte A qui permet la reconnaissance de nucléotides supplémentaires situés en 5' de l'hexamère consensus AGGTCA. Un domaine AF-2 est aussi conservé en C-terminal, celui-ci est le domaine de transactivation qui est associé à la liaison du ligand (Parker and Schimmer, 1997). En raison de la conservation de ce domaine, on pense qu'il pourrait exister un ligand pour SF1. Chez la drosophile, le récepteur homologue porte le nom *FTZ-F1* et régulerait l'expression du gène homéobox *fushi tarazu* (Ikeda et al., 1993). *SF1* est exprimé dans les surrénales, les gonades, les noyaux hypothalamiques ventromédiales et l'hypophyse. Son expression dans ce dernier organe apparaît à e13.5 et est

limitée aux cellules gonadotropes. Son expression est ainsi précédée par l' α -GSU, mais devance celles de la FSH β et LH β (Ingraham et al., 1994). L'inactivation génique de ce facteur affecte grandement l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et cause la mort des nouveau-nés une semaine environ après leurs naissances. Les souris SF1 $^{-/-}$ ne possèdent pas de surrénales ni de gonades et ont des anomalies au niveau de l'hypothalamus ; bien que peu développés, les organes génitaux internes et externes des mâles sont semblables à ceux des femelles. La mort est due à une insuffisance corticosurrénalienne et celle-ci peut être évitée par des injections de glucocorticoïde et de minéralocorticoïde. Le phénotype hypophysaire est une réduction de l'expression de l' α -GSU, l'absence de FSH β et LH β et du récepteur à GnRH (Shen et al., 1994; Luo et al., 1994; Ingraham et al., 1988). Par contre, ces effets sont secondaires et encore mystérieux. Les souris SF1 $^{-/-}$ possèdent toujours des neurones GnRH qui expriment des niveaux apparemment normaux de GnRH et le contact avec l'éminence médiane semble s'effectuer normalement. De façon surprenante, des injections de GnRH corrigent le phénotype hypophysaire, mais pas les autres (Barnhart and Mellon, 1994). Il semble donc que SF1 ne soit pas essentiel à la différenciation et à la prolifération des cellules gonadotropes. Par contre, l'inactivation génique hypophyse-spécifique du locus *LoxP-SF1* par expression de la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur α -GSU cause une absence de l'expression des hormones FSH β et LH β , démontrant ainsi que SF1 est important pour l'expression de ces hormones (Zhao et al., 2001). Chez ces souris aussi, l'injection de GnRH compense l'absence de SF1 et l'hypophyse réexprime les hormones FSH β et LH β !

Il est aussi intéressant de noter que SF1 synergise avec Pitx1 sur le promoteur LH β et que cette synergie serait due à une interaction physique directe entre ces facteurs. Cette interaction permettrait un changement conformationnel de SF1 qui mimerait un état de SF1 lié à son ligand putatif (forme active) qui agirait alors avec puissance sur le promoteur LH β (Tremblay et al., 1999).

I.6.3.3 Récepteur des glucocorticoïdes (GR)

Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est un facteur nucléaire dont l'activité dépend des glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes lipophiles qui traversent la membrane cytoplasmique. Lorsque les glucocorticoïdes arrivent dans le cytoplasme, ils se lient à GR de façon spécifique grâce au domaine de liaison du ligand. Cette liaison du ligand permet le passage de GR au noyau et provoquerait un changement allostérique qui amènerait GR dans une forme active qui reconnaît alors une séquence spécifique de l'ADN. Cette liaison à l'ADN peut avoir un effet transcriptionnel d'activation ou de répression. GR est impliqué notamment dans le contrôle du métabolisme, la réponse au stress, le cycle circadien et le développement embryonnaire. Dans l'hypophyse, GR est un régulateur négatif de la production de l'ACTH; cette régulation négative constitue un élément important de rétroaction dans l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien HHS (Grossman, 1995). Typiquement, l'activation de l'axe HHS se produit lorsque l'hypothalamus est stimulé par un stress important (comme écrire une thèse): la sécrétion de la CRH est alors induite dans l'hypothalamus. La CRH se rend à l'hypophyse par un réseau de capillaires qui rejoint le système porte hypophysaire (Grossman, 1995). Cette hormone agit par un récepteur à sept domaines transmembranaux (le récepteur à CRH) qui active la voie de transduction de la PKA et stimule la sécrétion d'ACTH et la synthèse de l'ARN messager POMC (Drouin et al., 1998b). Puis l'ACTH agit sur les surrénales pour augmenter la sécrétion de glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes lient GR qui agit alors dans la boucle de rétroaction négative qui s'exerce à la fois au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse pour diminuer la sécrétion d'ACTH (Drouin, 1993). L'ablation génique de GR a plusieurs effets : une atélectasie des poumons qui cause la mort postnatale ; des problèmes au niveau du foie dans l'expression des enzymes gluconeogéniques ; une hyperplasie du cortex surrénalien ; perte par l'apoptose des thymocytes-dépendants des glucocorticoïdes et un problème prolifératif des progéniteurs des cellules érythroïdes. Chez les souris GR $-/-$ il y a une augmentation de la sécrétion d'ACTH et de CRH, présumément à cause de l'ouverture de la boucle de

rétroaction négative qui est bloquée au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus (Cole et al., 1995). L'expression de la POMC est diminuée dans le lobe intermédiaire, contrairement à l'ACTH du lobe antérieur. Enfin, la PRL est élevée d'un facteur trois par rapport aux souris normales. Une souris transgénique qui exprime une forme mutante de GR (GR^{dim}) a été générée par insertion génique au locus GR, ce GR mutant ne dimérise plus et ne lie plus l'ADN des éléments de réponse positive (glucocorticoid response element, GRE) mais peut toujours réprimer en trans. Ce mutant consiste en un changement de l'alanine 458 pour une thréonine située dans la boîte D. Ce motif sert d'interface de dimérisation et cette mutation empêche la dimérisation et la liaison à l'ADN. Ces souris GR^{dim}/GR^{dim} sont viables et l'atélectasie pulmonaire est disparue (Reichardt et al., 1998). Du point de vue hypophysaire, l'expression de POMC demeure élevée, mais la sécrétion d'ACTH est cependant normale, de même que le niveau de CRH hypothalamique. Ceci signifie que la liaison à l'ADN du récepteur GR est essentielle dans la répression de l'expression de l'ACTH, ce qui est en accord avec le mécanisme de répression par le nGRE identifié dans le promoteur POMC (Drouin et al., 1993). Cette répression par les glucocorticoïdes est active à partir de e15.5 chez le rat, ce qui correspond à e14.5 chez la souris (Lugo and Pintar, 1996a), mais cette activité ne semble pas affecter la différenciation des cellules hypophysaires lors du développement (Lugo and Pintar, 1996b). GR joue donc un rôle dans l'homéostasie de l'axe HHS, mais n'est pas essentiel à la différenciation ni au développement hypophysaire.

1.6.3.4 Récepteur des estrogènes ($ER\alpha$)

$ER\alpha$ est un récepteur nucléaire qui a pour ligand l'estrogène. $ER\alpha$ pourrait jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle de PRL. Il peut activer la transcription de *PRL* lorsque lié à son ligand et cette activation se fait par la liaison directe de $ER\alpha$ sur l'enhancer distal du promoteur PRL (Scully et al., 1997). Des traitements aux estrogènes augmentent l'hypersensibilité à la DNase I de ce promoteur. De plus, il existe une association synergique entre $ER\alpha$ et Pit1 sur le

promoteur PRL. $ER\alpha$ est exprimé tardivement dans l'hypophyse, c'est-à-dire à partir de e16.5 et cette expression est maintenue chez l'adulte (Kioussi et al., 1999a). Son inactivation génique cause une baisse dramatique de l'expression de PRL au niveau du messager (20 fois), mais l'effet au niveau de la protéine détectée en immunohistochimie n'est pas aussi marqué (Scully et al., 1997). Il y a une diminution du nombre de cellules lactotropes, plutôt qu'une diminution de la quantité de PRL par cellule. Il semble donc que $ER\alpha$ à un effet prolifératif sur les cellules lactotropes, mais n'est pas nécessaire pour leur différenciation. Il est aussi intéressant de noter que le niveau d'expression de la POMC et le nombre de cellules corticotropes ont augmenté d'un facteur deux ou trois, en absence de ce récepteur nucléaire.

I.6.3.5 Tpit

Tpit est un facteur à boîte T qui a été cloné dans notre laboratoire par PCR dégénéré. Tpit lie une séquence d'ADN qui est située à quelques bases en amont du site Pitx1 sur le promoteur de POMC. Tpit active la transcription de façon synergique avec Pitx1, probablement en liant l'ADN de façon coopérative avec Pitx1, ce qui fait dire que Tpit serait le partenaire de Pitx1. Tpit à un patron d'expression exclusif aux cellules POMC de l'hypophyse. Il est exprimé à e12.5 dans l'hypophyse antérieure où il est restreint aux cellules corticotropes et puis il apparaît à e14.5 dans les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire. Des expériences de transgénèses où T-pit est exprimé ectopiquement sous le contrôle de promoteur α -GSU dans les cellules de la partie la plus rostrale de l'hypophyse ont montré une induction de l'expression de la POMC. Cependant, ces cellules expriment toujours α -GSU et j'ai démontré qu'elles n'expriment pas NeuroD1. Il est donc difficile de dire si ces cellules sont corticotropiques puisqu'elles expriment toujours l' α -GSU et qu'elles sont NeuroD1-négatives. L'absence de NeuroD1 suggère que ces cellules seraient transformées en mélanotropes, mais la présence d' α -GSU dans ces cellules semble indiquer que la différenciation n'est

pas complète (Lamolet et al., 2001). Une analyse plus poussée sera nécessaire pour démontrer la nature de ces nouvelles cellules.

I.6.3.6 Otx1

Otx1 est un facteur à homéodomaine appartenant à la famille bicoïde, tout comme Pitx1. *Otx1* possède un patron d'expression hypophysaire particulier : ce facteur est absent lors du développement embryonnaire et foetal de l'hypophyse, mais exprimé à un très bas niveau de la naissance jusqu'à l'adulte. Les embryons *Otx1* *-/-* montrent une diminution transitoire de l'expression de GH et de FSH β et la LH β , ce qui explique l'hypogonadisme et le nanisme transitoire observé chez ces souris. Il semblerait que ces hormones soient contrôlées directement par *Otx1*, puisque des expériences en transfections montrent une activation de ces promoteurs, de même que pour le promoteur α -GSU. En plus, ces promoteurs possèdent des sites consensus TAA/gCC que *Otx1* peut lier *in vitro* (Acampora et al., 1998). Ainsi, *Otx1* joue un rôle dans le développement hypophysaire postnatal, mais ce rôle peut ensuite être remplacé par un ou plusieurs facteurs (toujours inconnus), puisque l'effet de la délétion de *Otx1* n'est que transitoire (Kioussi et al., 1999a).

Tableau I.1 Apparition des facteurs de transcription hypophysaire durant le développement. Le + signifie que le facteur est exprimé dans la fenêtre de temps indiquée. Si le + se retrouve plus à droite, cela signifie que son expression correspond au temps tardif indiqué et s'il est plus à gauche, l'expression survient au temps précoce indiqué. Le +/- indique une faible expression et le - signifie une incapacité à détecter une expression significative.

	E6.5- E7.5	E8.5- E9.5	E10.5- E11.5	E12.5- E14.5	E15.5- E17.5	E18.5- E19.5	P0
Six3	+	+	+	+	+	-	-
Rpx	+	+	+	+	-	-	-
Pitx1		+	+	+	+	+	+
Pitx2		+	+	+	+	+	+
Lhx3	-	+	+	+	+	+	+
Lhx4	-	+	+	+	+/-	+/-	+/-
Pax6	-		+	+	+	-	-
Prop1	-	-	+	+	+	+/-	+/-
Pit1	-	-	-	-	+	+	+
SF1	-	-	-	+	+	+	+
GR	-	-	-		+	+	+
ER α	-	-	-	-	+	+	+
Tpit	-	-	+	+	+	+	+
Otx1	-	-	-	-	-	-	+/-

I.7. Objectifs de travail

J'ai initié ces travaux de thèse en sachant que la boîte E_{neuro} (DE2C) agissait en combinaison avec le site Pitx1 (CE3) pour former une synergie transcriptionnelle spécifique aux cellules corticotropes de l'hypophyse. Bien que l'activité spécifique reliée à la boîte E_{neuro} ait été préalablement démontrée comme étant une activité provenant d'un facteur bHLH spécifique aux cellules corticotropes (CUTE), l'identité de celui-ci était inconnue. Ainsi, la première partie de mon travail a été d'identifier le facteur responsable de l'activité CUTE. Cette activité que nous recherchions devait fort probablement provenir d'un facteur bHLH à expression restreinte et celui-ci devait être capable d'activer spécifiquement la boîte E_{neuro} , et être exprimé dans les cellules corticotropes de l'hypophyse. Dans le chapitre II, je démontre que *NeuroD1* est le facteur qui procure cette activité spécifique aux cellules corticotropes.

Le second objectif de mes études de thèse a été d'identifier le mécanisme moléculaire responsable de la synergie transcriptionnelle entre bHLH et Pitx1. Les effets synergiques transcriptionnels peuvent se produire à différentes étapes de l'activation transcriptionnelle. La synergie pourrait résulter d'interactions protéiques directes entre activateurs de la transcription ou entre activateurs et co-facteurs ou encore entre activateurs et les facteurs généraux de la transcription ce qui aura comme effet de stabiliser l'ensemble de l'appareil transcriptionnel. Dans le chapitre III, je démontre que les facteurs bHLH et Pitx interagissent directement et que cette interaction se produit par l'intermédiaire de *Pan1*, un facteur bHLH ubiquitaire. De plus, j'ai montré que *NeuroD1* a un patron d'expression restreint aux cellules corticotropes de l'hypophyse et qu'il apparaît durant le développement quelques heures avant l'expression du gène *POMC*.

Enfin, l'implication d'un facteur bHLH ubiquitaire, nous a amené à vérifier l'hypothèse d'un rôle plus général de la synergie bHLH-Pitx. Ainsi, j'ai poursuivi des expériences de transfection dans un contexte musculaire où l'on retrouve

l'expression des facteurs myogéniques de type bHLHs. J'ai alors mis en évidence que le facteur Pitx1 était effectivement capable d'activer la transcription de façon synergique avec l'hétérodimère MyoD/Pan1 sur le promoteur de l' α -actine squelettique. Appuyant cette découverte, j'ai montré que *Pitx1* est exprimé dans les cellules musculaires, rendant cette synergie MyoD/Pan1-Pitx potentiellement très intéressante dans le cadre de la différenciation des cellules musculaires. Ces résultats, bien que préliminaire, sont présentés en annexe.

L'ensemble de ces travaux m'a donc permis de montrer l'importance des interactions synergiques de type bHLH-Pitx dans les cellules corticotropes de l'hypophyse et d'envisager que ces interactions synergiques puissent être utilisées dans d'autres contextes cellulaires, comme celui de la différenciation des cellules musculaires.

Chapitre II

NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene

Article publié

Molecular and Cellular Biology, July 1997, vol20, No13, pp 4826-4837

Gino Poulin, Benjamin Turgeon, Jacques Drouin*

Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal
110 avenue des Pins Ouest
Montréal QC Canada H2W 1R7

II.1. Abstract

NeuroD1/BETA2 is a bHLH factor expressed in the endocrine cells of the pancreas and in a subset of neurons as they undergo terminal differentiation. We now show that NeuroD1 is expressed in corticotroph cells of the pituitary gland and that it is involved in cell-specific transcription of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene. It was previously shown that corticotroph-specific POMC transcription depends in part on the action of cell-restricted bHLH factors that were characterized as the CUTE (Corticotroph Upstream Transcription Element) (Therrien and Drouin, 1993) complexes. We now demonstrate that these complexes contain NeuroD1 in association with various ubiquitous bHLH dimerization partners. The NeuroD1-containing heterodimers specifically recognize and activate transcription from the POMC promoter E-box that confers transcriptional specificity. Interestingly, the NeuroD1 heterodimers activate transcription in synergy with Ptx1, a *bicoid*-related homeodomain protein, which also contributes to corticotroph specificity of POMC transcription. In the adult pituitary gland, NeuroD1 transcripts are detected in POMC-expressing corticotroph cells. Taken together with the restricted pattern of Ptx1 expression, these results suggest that these two factors establish the basis of a combinatorial code for the program of corticotroph-specific gene expression.

II.2. Introduction

Families of cell-restricted bHLH transcription factors control differentiation in many cell lineages. For example, the myogenic bHLH factors are involved in various steps of myogenesis and they do so as muscle-specific transcription factors (Weintraub, 1993; Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993; Olson and Klein, 1994; Rudnicki et al., 1993; Zhang et al., 1995). Similarly, Tal-1/SCL is required for differentiation of the hematopoietic lineage (Aplan et al., 1992; Shivdasani et al., 1995) and a growing family of neurogenic bHLH factors has been identified in neural tissues. The Mash-1 and HES-1 bHLH factors that were originally cloned by homology to the *Drosophila* genes *achaete-scute* and *Hairy and Enhancer of Split* behave as positive and negative regulators, respectively, of neurogenesis (Guillemot et al., 1993; Ishibashi et al., 1995; Ishibashi et al., 1994). The function of other neural-specific bHLH factors are not yet known (McCormick et al., 1996; Ma et al., 1996; Kageyama et al., 1995). One member of this group, NeuroD1, was recently shown to be associated with late neuronal differentiation in *Xenopus* (Lee et al., 1995). The same factor was also isolated as BETA2, a cell-specific transcription factor of the insulin gene (Naya et al., 1995). Thus, this so-called "neural-specific" bHLH factor is also expressed in a small subset of endocrine cells of the pancreas. We now report on the expression and transcriptional role of NeuroD1/BETA2 in specific endocrine cells of the anterior pituitary gland that express the POMC gene.

The development of the neuroendocrine system is highly integrated; indeed, pituitary and hypothalamic development is intimately associated as disruption of one affects the other (Kawamura and Kikuyama, 1995; Kawamura and Kikuyama, 1992; Kikuyama et al., 1993). The pituitary gland develops from a placodal invagination of the stomodeum starting at embryonic day 8.5 (E8.5) in mice (Andersen and Rosenfeld, 1994). The structure formed by this invagination, known as Rathke's pouch, develops in close contact with the neuroepithelium of the ventral diencephalon fated to become the hypothalamus (Schwind, 1928). A projection of the hypothalamus (the infundibulum) will develop

into the posterior lobe of the pituitary while Rathke's pouch will become the anterior and the intermediate lobes of the gland. Throughout morphogenesis, specific hormone-producing cells differentiate according to a well conserved sequence (Voss and Rosenfeld, 1992). The first cells to reach final differentiation in this sequence (at E12.5) are the POMC-expressing cells of the anterior lobe, the corticotrophs. These cells process POMC into ACTH (adrenocorticotrophic hormone), hence their name. Another POMC-expressing lineage appears later at E14.5: the melanotroph cells of the intermediate pituitary which process POMC into α -MSH (melanocyte-stimulating hormone) (Japon et al., 1994).

Previous work to identify mechanisms for corticotroph-specific transcription of the POMC gene indicated that two regulatory elements of the promoter are sufficient to recapitulate this activity. Different transcription factors bind these two elements and exert synergistic effects on transcription (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993). Consistent with the apparent tissue-specificity of this synergism, cognate DNA-binding proteins for these elements have a restricted distribution. One of these elements (CE3) is the binding site of *Ptx1*, a bicoid-related homeogene expressed in the pituitary (Lamonerie et al., 1996). The activity of this element is synergistically and specifically enhanced in corticotroph cells by a target site for bHLH factors, an E-box element (Fig. 2.1A). This E-box, DE2C, is bound by corticotroph-restricted bHLH proteins that appear as two bands in gel retardation. These two complexes were previously named CUTE for Corticotroph Upstream Transcription Element (Therrien and Drouin, 1993). bHLH transcription factors must form dimers through their HLH domains in order to bind DNA; protein:DNA interactions depend upon the basic region (Murre et al., 1989a; Ma et al., 1994). The class I (or ubiquitous) bHLH factors can form homodimers and the class II (or tissue-restricted) bHLH factors are active as heterodimers in association with class I factors (Lassar et al., 1991). Since the CUTE complexes have a restricted distribution, they may very well be heterodimers of class I and II bHLH factors. The DE2C E-box of the POMC gene has the same sequence as the cell-specific E-box of the insulin promoter that

was used as probe to clone BETA2 (Naya et al., 1995; Karlsson et al., 1987; German et al., 1992; Cordle et al., 1991). Hence, the CUTE complexes may contain NeuroD1 or a related factor of similar DNA-binding specificity.

We now report that NeuroD1/BETA2-containing heterodimers specifically bind and activate transcription from reporters containing the DE2C E-box. Further, we show that these heterodimers activate transcription synergistically with Ptx1 in heterologous cells. We also show that the CUTE complexes contain NeuroD1. In addition, NeuroD1 expression appears to be restricted to a subset of pituitary cells that includes the corticotrophs. These data support the model that NeuroD1 is part of a transcriptional complex which triggers corticotroph-specific transcription and cell differentiation during pituitary ontogeny.

II.3. Materials and methods

II.3.1 Plasmids and oligonucleotides.

The different reporter plasmids were constructed in the vector pXP1-luciferase as described previously (Nordeen, 1988). The DE2C, CE1B, CE1A, DE2 and CE3 elements inserted into the reporter plasmids were made from oligonucleotide sequences of the corresponding regions of the rPOMC promoter as described previously (Therrien and Drouin, 1993; Lamonerie et al., 1996). The expression vectors of the bHLH factors used in this study were described in previous work: BETA2/NeuroD1 (Naya et al., 1995), ME1a and ME1b (Chiaramello et al., 1995), Pan1 and Pan-2 (Nelson et al., 1990) and Id (Benezra et al., 1990).

II.3.2 Cell culture and nuclear extracts.

L cells (Jeannotte et al., 1987) were grown in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) with 10% newborn calf serum and maintained at 37 °C and 5% CO₂. AtT-20 D16v cells (Therrien and Drouin, 1991) were grown under the same conditions, but fetal bovine serum was used, also at a concentration of 10%.

The nuclear extracts were prepared as described previously (Therrien and Drouin, 1993). Briefly the cells were harvested using 0.5 mM EDTA in PBS and gently spun down. The supernatant was removed and the cells resuspended in a buffer containing protease inhibitors, 10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT. The cells were left on ice for 15 minutes to swell and then Nonidet P-40 was added to a final concentration of 0.66%. The cells were then vortexed vigorously for 10 seconds and centrifuged at 12000 rpm. The supernatant was subsequently removed and the pellet of nuclei was resuspended in a similar buffer as described above except containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 400 mM NaCl, and no KCl. The nuclei were then shaken on a shaking platform for 30 minutes, spun down and the supernatant kept at -70 °C. The protein concentration was subsequently estimated using the Bradford assay.

II.3.3 Transfection assays.

L cells were transfected using the calcium phosphate co-precipitation method. The precipitate containing 3 μg of reporter plasmid, 1 μg of expression vector, 1 μg of RSV-GH plasmid as an internal control, and carrier DNA up to a total of 10 μg was applied to 10^5 cells in a 35-mm Petri dish. Control samples contained equivalent amounts of empty expression vector or pSP64. After 16 hours, the medium was changed, and the cells were harvested 24 hours later using 0.5 mM EDTA in PBS. In Figure 8B, 1.5 μg per dish of the reporter plasmid was used; NeuroD1 expression vector was used at 1 μg per dish; Pan1, Ptx1, and Id effectors at 0.5 μg . Overexpression of different factors for preparation of nuclear extracts and for use in EMSA experiments was accomplished by similar transfections using 5 μg of each expression plasmids. AtT-20 cells were transfected using lipofectamine (Pharmacia). 0.5×10^6 cells were plated into 35-mm Petri dishes. 500 ng of reporter plasmid, 25 ng of Id expression vector and carrier DNA up to a total of 800 ng were used together with 4.5 μl of lipofectamine (Pharmacia) in a final volume of 200 μl of DMEM without serum. The volume was made up to 1 ml with DMEM after 30 min and left for 4 hours on the cells. 1 ml of DMEM containing 10% FBS was then added. The cells were harvested 20 hours later using 0.5 mM EDTA in PBS. Data were compared using Student's t test.

II.3.4 Northern blot analysis.

Total cellular RNA was isolated using the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987). RNA was analyzed by electrophoresis on 1.2% agarose gel using the RNA-glyoxal method (Maniatis et al., 1982). Transfer was performed on Hybond-N (Amersham) membrane. Probe was made by random priming on an Apal-PstI fragment of unique (i.e. not conserved in NeuroD2 and 3) sequence in the 3' coding region of NeuroD1. Blots were washed for 30 min at 65⁰C in 0.1X SSC/0.1% SDS. 18S rRNA was revealed using 18S RNA specific oligonucleotide (ACG GTA TCT GAT CGT CTT CGA ACC) labeled with [γ -³²P]ATP. Hybridization was performed in 6X SSC 5%

Denhardt, 1% SDS, 0.05% sodium pyrophosphate and salmon sperm DNA (50 $\mu\text{g/ml}$) at 42°C overnight. Washes were performed in 6X SSC, 0.05% sodium pyrophosphate and 1% SDS at 55°C for 45 min.

II.3.5 Histochemistry.

Immunohistochemistry was performed using an anti-ACTH monoclonal antibody (Cortex Biochemicals) produced against the amino terminal part of ACTH and anti-TSH β antibodies produced in rabbit (AFP4492192 provided by Dr. A.F. Parlow, Pituitary Hormones and Antisera Center, Torrance CA). Anti-mouse and anti-rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase were used to reveal hormone-antibody complexes. The procedures followed for immunohistochemistry and *in situ* hybridization were as described previously (Lamonerie et al., 1996; Lanctôt et al., 1997). Briefly, adult male pituitaries were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded and sectioned in slices of 5 mm thickness. The hybridizations were carried out at 52.5°C using an ^{35}S -UTP labeled probe. The washes were performed in 1X SSC, 50% formamide at 62°C. The slides were then treated with RNase A (20 $\mu\text{g/ml}$), for 30 minutes at 37°C, followed by another 1X SSC, 50% formamide wash at 62°C. Two different cRNA probes were generated for NeuroD1. One probe of about 700 nt contained 3'-untranslated sequence and the C-terminus of NeuroD1 including the bHLH-coding domain whereas another probe of 180 nt excluded the bHLH coding region. These different probes gave similar results. Sense probes made from corresponding fragments did not give any significant signal.

II.3.6 Electrophoretic migration shift assays (EMSA).

The gel shift assays were performed using 5% polyacrylamide gels (44:1 acrylamide:bis-acrylamide) in 40 mM Tris-HCl and 195 mM glycine (pH 8.5) at 4°C. The probe sequences were:

5'-GAT CCG GAA GGC AGA TGG ACG CA-3' (DE2C), and 5'-GAT CCG GGG CCA GGT GTG CGC TA-3' (CE1B). We used 10 000 cpm per reaction (~15 fmol) of double-stranded oligonucleotide probes, end-labeled by filling-in with Klenow in the presence of ^{32}P - α -dCTP, and purified on G-25 Sephadex column.

The reactions were performed in 20 μ l containing 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulphonic acid (HEPES, pH 7.2), 150 mM KCl, 5 mM DTT, 10% glycerol, 1-2 μ g of a 1:1 mixture of poly (dl-dC) and poly (dA-dT), and 5 μ g of nuclear extracts. The reactions were incubated for 30 min. on ice prior to loading. The samples were separated by electrophoresis for 3 to 3.5 h. For supershift experiments, the antibodies (from Dr. M. Tsai, Santa Cruz, as indicated) were preincubated with the nuclear extracts for 15 minutes on ice prior to probe addition.

II.4. Results

II.4.1 Transcriptional specificity of NeuroD1.

The CUTE complexes were previously characterized as bHLH factors that specifically bind the DE2C E-box (Therrien and Drouin, 1993), and not other E-boxes of the POMC promoter (McDonald et al., 1996). The POMC promoter contains three E-boxes (Fig. II.1) but corticotroph-specific transcription can only be conferred by DE2C. Therefore, DE2C plays a unique role by recruiting corticotroph-restricted bHLH factor(s) to the POMC promoter. Since BETA2/NeuroD1 was shown to activate transcription from a similar E-box in the insulin promoter (Naya et al., 1995), we tested whether it acts on the POMC promoter E-boxes.

Three copies of each POMC promoter E-box (DE2C, CE1B and CE1A, Fig. II.1A and B) were cloned upstream of a luciferase reporter containing a minimal POMC promoter (-35/+63 bp) fragment (Therrien and Drouin, 1991). Mammalian expression vectors for NeuroD1 and Pan1 were co-transfected with these reporters into L cells. These cells do not express NeuroD1 (Northern blot, data not shown) and they do not express significant levels of class I bHLH factors either, as they are not detected in Western blots (data not shown) or in EMSA (e.g. Fig. II.3 and II.4).

NeuroD1 overexpression in L cells did not increase the transcriptional activity of any of the three E-box reporter plasmids (Fig. II.2, NeuroD1 compared

to control). Overexpression of Pan1 alone did not affect the transcriptional activity of the DE2C reporter (Fig. II.2A, Pan1), but enhanced the transcriptional activity of the CE1B and CE1A reporters (Fig. II.2B and C, respectively). However, co-expression of NeuroD1 and Pan1 led to a significant increase of the DE2C reporter activity (Fig. II.2A, NeuroD1/Pan1 compared to NeuroD1 or Pan1), but did not significantly enhance the activity of either the CE1B or CE1A reporters beyond the effect of Pan1 alone (Fig. II.2B and C, Pan1 compared to NeuroD1/Pan1). Neither factor affected the activity of reporters devoid of E-boxes or containing a mutant E-box [(Therrien and Drouin, 1993) and data not shown]. Further, the few nucleotide differences between the E-boxes have marked effects on their activation by NeuroD1 and/or Pan1. These results strongly suggested that NeuroD1 transcriptional activity is dependent on specific recognition of the DE2C E-box. Thus, the transcriptional properties of NeuroD1/Pan1 heterodimers are consistent with the properties of the CUTE complexes and of their target DE2C (Therrien and Drouin, 1993). In contrast, the CE1B and CE1A E-boxes of the POMC promoter behave as targets of class I ubiquitous bHLH factors, albeit of different potencies.

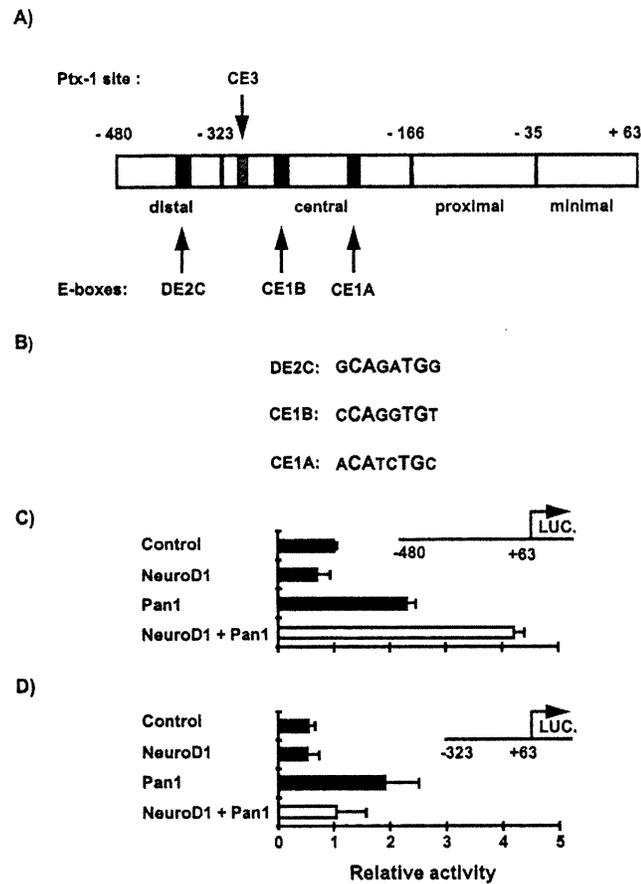


Figure II.1 . Schematic representation of the rat POMC promoter (-480 to +63 bp). **A)** Relative position of the DE2C, CE1B and CE1A E-boxes and of the Ptx1 binding site (CE3) within the POMC promoter. **B)** Nucleotide sequences of the three E-boxes of the promoter. Lower case letters represent variant nucleotides by comparison to the consensus sequence NCANNTGN. **C)** Effect of bHLH factor expression on full-length POMC-luciferase reporter. Expression vectors for NeuroD1 and/or Pan1 were transfected in CV-1 cells, and the luciferase (LUC.) activity (\pm standard error of the mean) is shown relative to that of the reporter alone. **D)** Same experiment as in C performed with a reporter plasmid containing a POMC promoter fragment deleted to bp - 323, which no longer contains the DE2C E box.

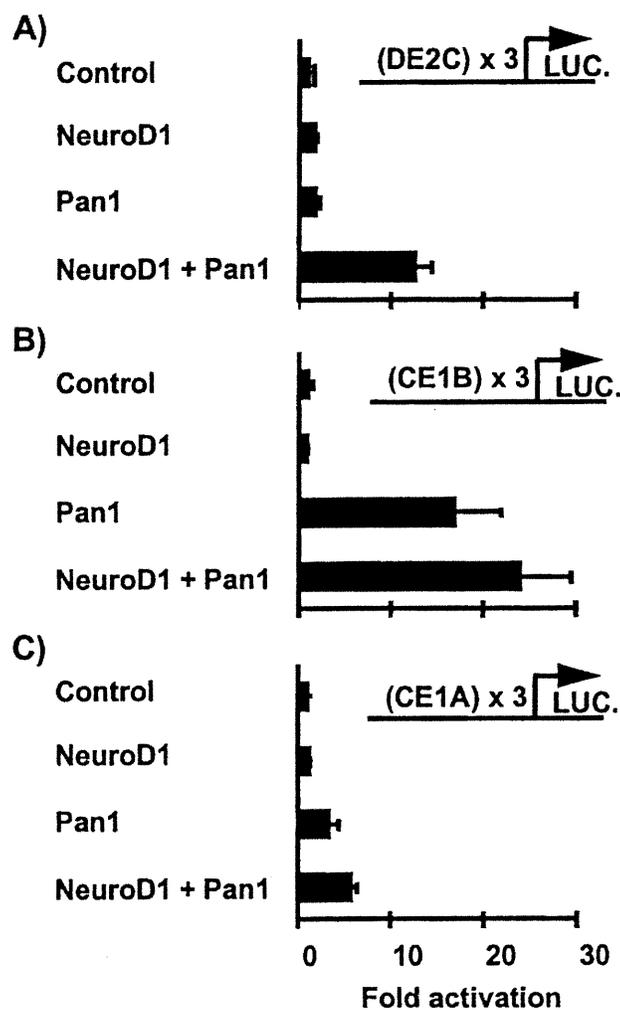


Figure II.2 Specificity of NeuroD1 activation of POMC promoter E-boxes. Reporter plasmids containing three copies of E-boxes DE2C (A), CE1B (B) and CE1A (C) were tested by cotransfection with expression vectors for NeuroD1 and/or Pan1. Results (+/- S.E.M.) are the average of at least 3 separate experiments, each performed in duplicate.

II.4.2 Specificity of NeuroD1/Pan1 heterodimer exerted at DNA binding.

The specificity of E-box recognition by NeuroD1/Pan1 heterodimers was tested by EMSA. The gel shift analyses were performed using the DE2C and CE1B probes and nuclear extracts from L cells expressing Pan1, Pan1 and NeuroD1 or neither. Cells expressing only NeuroD1 did not exhibit binding to either probe (data not shown), in agreement with experiments done using recombinant NeuroD1 (Naya et al., 1995). NeuroD1 and Pan1 were both required to bind DE2C as a unique band in EMSA (Fig. II.3, lane 3). Using the same nuclear extracts with the CE1B probe, there was no significant binding of similar migration (Fig. II.3, lane 4 compared to 3). Instead, all bands observed with the CE1B probe were dependent on Pan1 irrespective of the presence of NeuroD (Fig. II.3, lane 5). In agreement with the transfection data showing Pan1 transactivation of the CE1B, but not the DE2C reporter (Fig. II.2A and B), Pan1 dimer complexes did not bind DE2C (Fig. 3, lane 2). Taken together, these results demonstrate that the specificity of NeuroD1/Pan1 heterodimer action on transcription (Fig. II.2) is largely due to specific recognition of the DE2C E-box (Fig. II.3).

II.4.3 NeuroD1 is part of the CUTE complexes.

In order to test whether NeuroD1 is a component of the CUTE complexes of AtT-20 cells, we used anti-NeuroD1 antibodies (provided by M. Tsai, Baylor) in EMSA supershift assays. As control, we showed that NeuroD1/Pan1 heterodimers expressed in L cells (Fig. II.4, lane 3) were supershifted by the anti-NeuroD1 antibodies (Fig. II.4, lane 2). The two CUTE complexes (Therrien and Drouin, 1993) of AtT-20 cells (Fig. II.4, lane 4) were also supershifted in the presence of the anti-NeuroD1 antibodies (Fig. II.4, lane 5). Similar results (data not shown and Fig. II.6) were obtained with another antibody (Santa Cruz) made against a NeuroD1 peptide from a region unique to NeuroD1 by comparison to NeuroD2 and NeuroD3 (McCormick et al., 1996). Thus, both CUTE bands of

AtT-20 cells contain NeuroD1 and conversely NeuroD1, rather than other related gene products, appears to be the major class II component of CUTE complexes.

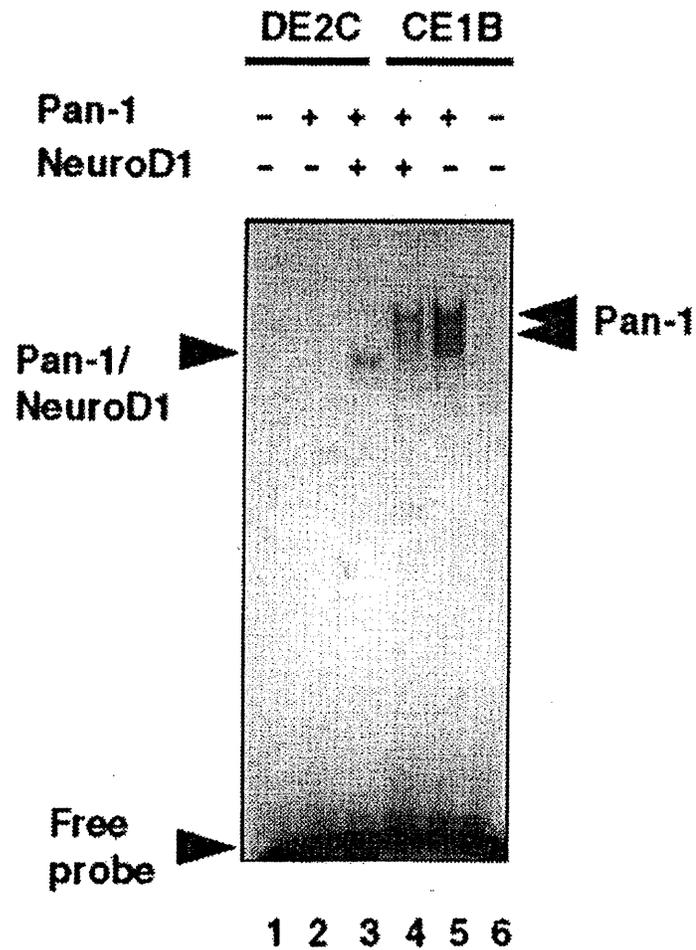


Figure II.3 Specific DE2C binding of NeuroD1/Pan1 heterodimers. EMSA was performed using radiolabeled DE2C and CE1B E-boxes as probes and nuclear extracts from L cells transfected with Pan1 and/or NeuroD1 expression vectors as indicated.

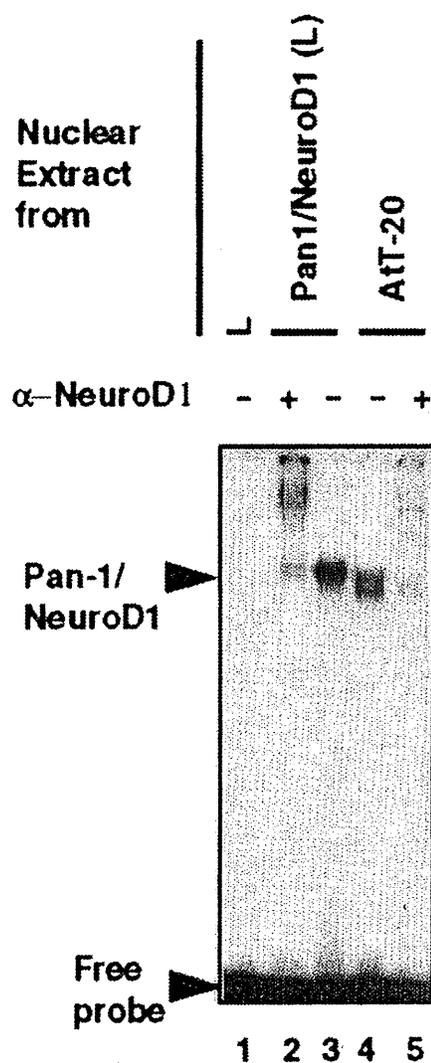


Figure II.4 CUTE complexes contain NeuroD1. EMSA was performed with radiolabeled DE2C E-box as probe and nuclear extracts from L cells expressing NeuroD1/Pan1, and from AtT-20 cells to reveal the CUTE complexes. Supershift was produced by addition of affinity purified antibodies against NeuroD1 (1.5 μ l α -NeuroD1), provided by M. Tsai or of normal rabbit serum (2 μ l) as control (-). The α NeuroD1 antibodies did not react with Pan1 [(Naya et al., 1995) and data not shown].

II.4.4 NeuroD1 forms active dimers with various class I bHLH factors.

Since NeuroD1 does not bind E-boxes on its own and requires a class I dimerization partner for activity (Fig. II.2), we tested whether the CUTE complexes contain products of the E2A gene; these include the differential splicing products Pan1 (E47), Pan-2 (E12) (Nelson et al., 1990), and ITF-1 (Henthorn et al., 1990). A commercially available antibody (Santa Cruz) that recognizes an epitope common to these gene products was used in gel shift analyses to demonstrate the presence of E2A gene products in the CUTE complexes of AtT-20 cells. As control, over-expressed NeuroD1/Pan1 heterodimers (Fig. II.5A, lane 3) were supershifted by the anti-E2A antibodies (Fig. II.5A, lane 4). However, only the slower migrating CUTE complex (Fig. II.5A, lane 1) was partially supershifted with saturating amounts of the anti-E2A antibody (Fig. II.5A, lane 2). This experiment suggested that E2A gene products are present in CUTE complexes. However, they may only account for about 25% of the CUTE complexes. Specific antisera against the other mouse class I bHLH are not available to test their presence in CUTE complexes. In an attempt to determine whether other class I factors can act with NeuroD, cotransfection assays and *in vitro* binding experiments by EMSA were performed. In transfection assays, all ubiquitous bHLH factors tested (Pan1/2, ITF2, HEB (ME1a and ME1b), activated a DE2 reporter in the presence of NeuroD1 (Fig. II.5C) but not when transfected alone (data not shown). In EMSA, all class I bHLH factors formed DE2C-binding heterodimers with NeuroD1 (Fig. II.5B). All these complexes migrated close to the position of the slower migrating CUTE complexes, suggesting that any of these could be present in CUTE complexes. Thus, ITF-2 and/or ME1a/b (HEB) may constitute the other 50% of the slow migrating CUTE band which is not accounted for by E2A products. Both of these (ITF-2 and ME1a/b) are expressed in AtT-20 cells (McDonald et al., 1996). The identity of the NeuroD1 dimerization partner of the faster migrating CUTE complex remains unknown.

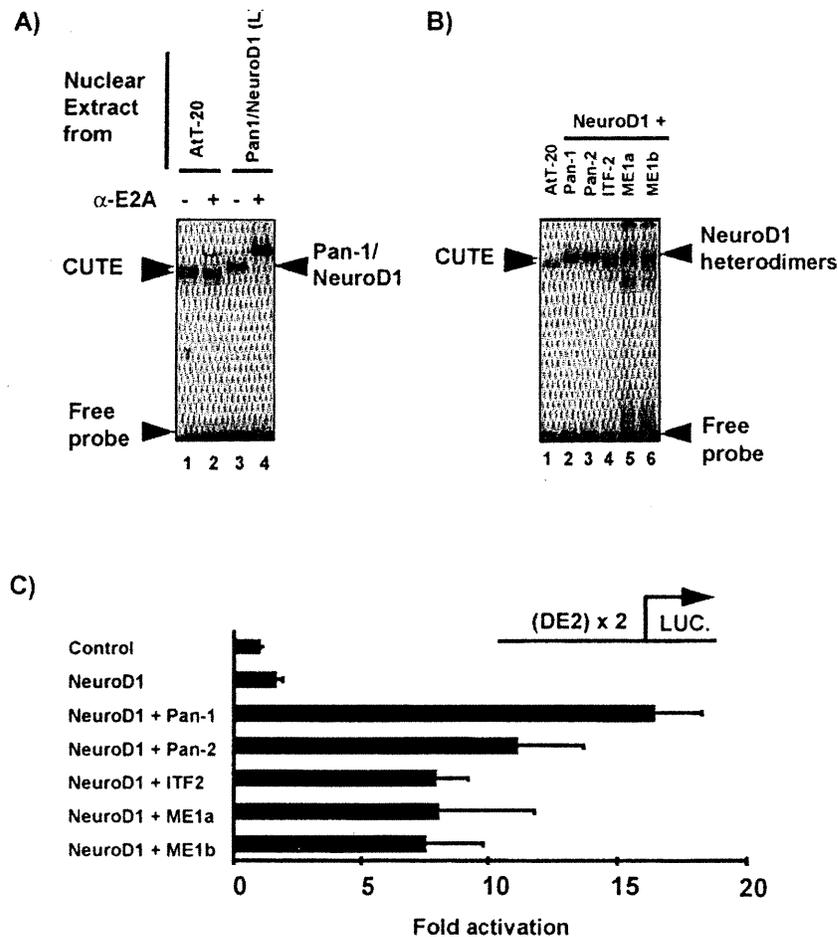


Figure II.5 Pan1, Pan2, ITF2, and ME1a/b can dimerize with NeuroD1. **A)** E2A gene products are present with NeuroD1 in the slower migrating CUTE complexes. Monoclonal antibodies against E2A (1.5 μ g α -E2A, Santa Cruz) and nuclear extracts from AtT-20 cells were used to demonstrate the presence of E2A products in these heterodimers, as in Figure 4. These antibodies were shown by the supplier not to cross-react with ITF-2 or HEB. **B)** NeuroD1 heterodimers formed with Pan1, Pan2, ITF2, ME1a and ME1b bind the DE2C probe. EMSA performed as in previous figures using probe and nuclear extracts from L cells cotransfected with expression vectors for NeuroD1 and indicated class I bHLH factors. **C)** Transactivation of the DE2 reporter plasmid by NeuroD1 heterodimers formed with either Pan1, Pan2, ITF2, ME1a and ME1b. Transfection assays performed as in Fig. 2.2.

II.4.5 NeuroD1 is restricted to corticotroph cells of the pituitary.

Since it was previously suggested that the CUTE complexes are restricted to pituitary corticotroph cells (Therrien and Drouin, 1993) and since NeuroD1 and its target DE2C are thought to contribute to POMC cell specificity, we determined whether NeuroD1 expression is restricted to a subset of pituitary cells. First, we used a panel of pituitary-derived cell lines to investigate DE2C-binding activity in EMSA (Fig. II.6A); cells representative of the corticotroph (AtT-20), somatolactotroph (GH3) and gonadotroph (α T3) lineages were used to prepare nuclear extracts.

Using anti-NeuroD1 antibodies, a complete supershift of the CUTE complexes present in AtT-20 cell extracts (Fig. II.6A, lanes 8 and 9) was observed with a relatively small amount of antibodies (0.5 μ g). In contrast, complexes observed with GH3 nuclear extracts did not show any supershift with the NeuroD1 antibodies (Fig. II.6A, lanes 4 to 6), indicating that the DE2C-binding activity of these somatolactotroph cells does not contain NeuroD1. This was confirmed by absence of NeuroD1 transcripts in these cells (Fig. II.6B, lane 3). Complexes formed with α T3 nuclear extracts were partially blocked by NeuroD1 antibodies (Fig. II.6A, lanes 1 to 3). However, complete blocking or supershift were not observed, even with antibody amounts sufficient to completely supershift the CUTE complexes of AtT-20 cells. These data suggest that NeuroD1 may account for part of the DE2C binding activity of α T3 cells as confirmed by Northern blot (Fig. II.6B, lane 2) showing NeuroD1 mRNA in these cells; however, the remainder of the DNA binding activity is probably due to other bHLH proteins. These experiments suggest that NeuroD1 may not be ubiquitously expressed in the pituitary since it is not expressed in somatolactotroph cells which represent around 50% of the cells.

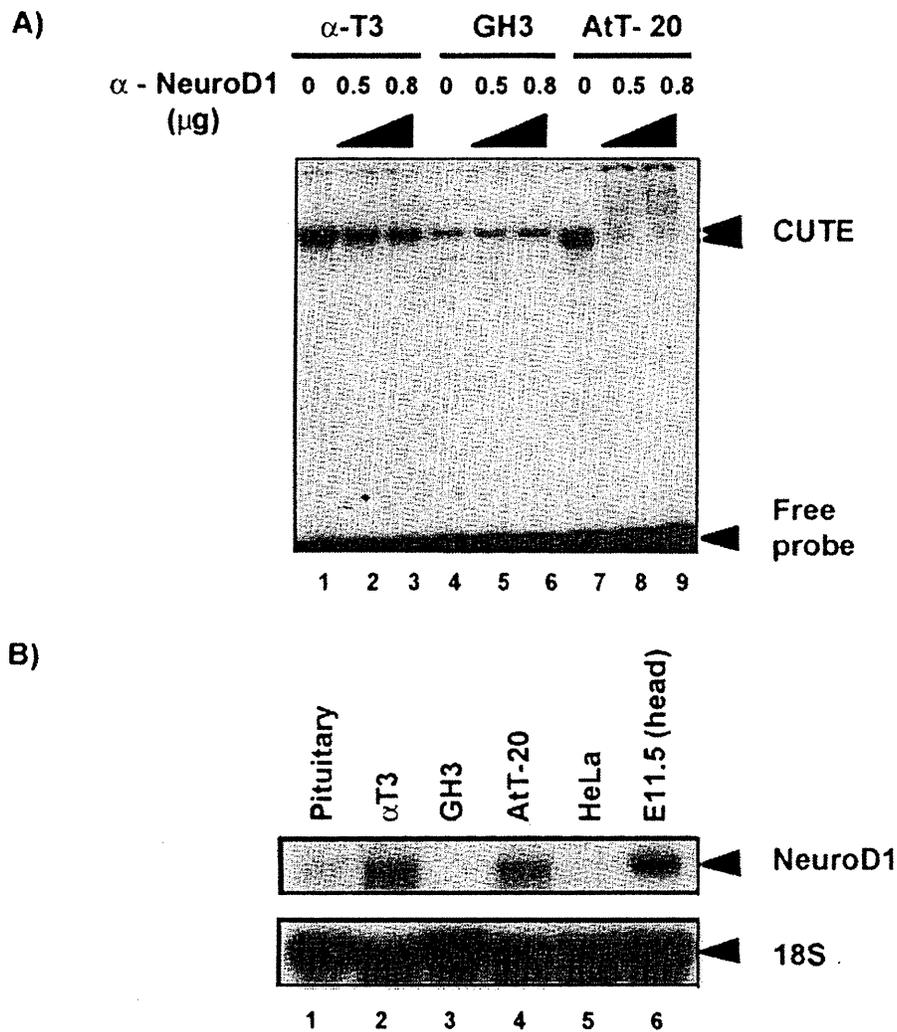


Figure II.6 DE2C-binding activity in different pituitary lineages (α T3, GH3 and AtT-20 cells). **A)** DE2C-binding activity in extracts (10 μ g) from α -T3, GH3 and AtT-20 cells. Supershift experiments performed as in Fig. 2.4 and 2.5 using antibodies (Santa Cruz) against NeuroD1 (α -NeuroD1) at 0, 0.5 and 0.8 μ g per reaction. The binding activity detected in GH3 cells is bHLH as it is supershifted by the E2A monoclonal antibodies (data not shown). **B)** NeuroD1 mRNA expression in cells derived from different pituitary lineages in adult pituitary and in head of E11.5 embryo. 18S RNA was revealed as internal control.

In order to extend this conclusion to normal pituitary tissues and cells, we performed colocalization of NeuroD1 by *in situ* hybridization and hormone by immunohistochemistry. ACTH-producing cells or TSH β (β subunit of thyroid-stimulating hormone) -producing cells were identified with specific antibodies against ACTH and TSH β . We used the TSH β -positive cells as control for colocalization in these experiments because they are the least abundant hormone-producing cells in the anterior pituitary. This was followed by *in situ* hybridization using an ^{35}S -UTP labeled NeuroD1 probe. A sense NeuroD1 probe was used as negative control and it did not show significant labeling of any cell (data not shown). This approach was taken because the available anti-NeuroD antibodies were not sensitive enough to reveal a specific NeuroD signal in tissue sections.

At first glance, it appeared that NeuroD1-positive cells were also ACTH-positive (Fig. II.7A). In order to substantiate this, silver grains were counted over horseradish peroxidase-positive (i.e. ACTH-positive) and negative cells. This analysis (Fig. II.7B) showed preferential labeling of ACTH-positive cells with the NeuroD1 probe. In contrast, we did not observe co-localization of NeuroD1 and TSH β (Fig. II.7C and D). Thus, it appears that NeuroD1 is preferentially expressed in corticotroph cells of the adult pituitary, although low level expression in other cells would not be discriminated from background in these experiments.

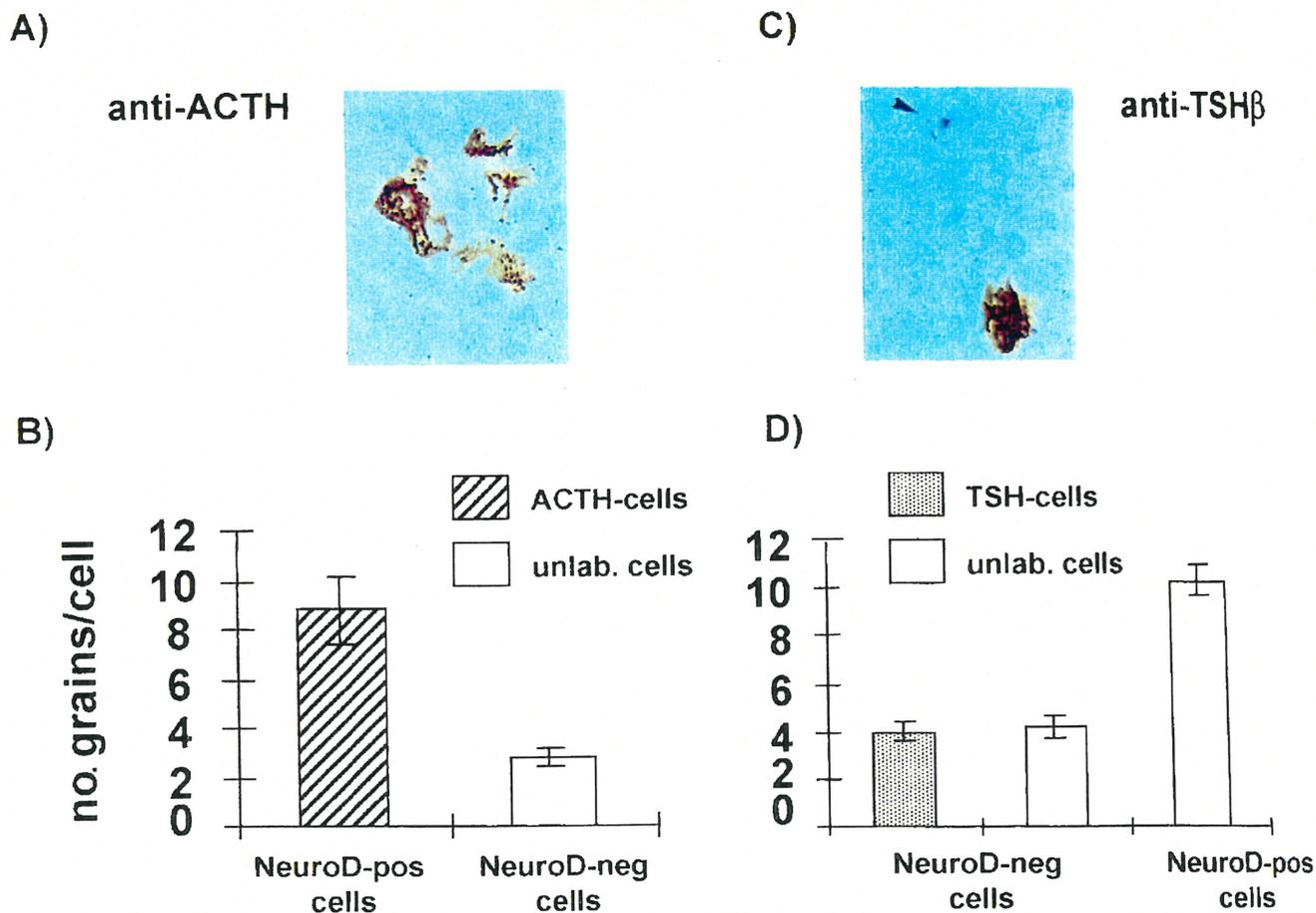


Figure II.7 Cellular localization of NeuroD1 mRNA in pituitary. **A)** Co-localization of NeuroD1 with ACTH in adult male pituitary. Corticotroph cells were identified by ACTH immunohistochemistry (brown reaction product of horse radish peroxidase (HRP)) and NeuroD1-expressing cells were revealed by *in situ* hybridization using a ^{35}S -labeled NeuroD1-specific antisense probe. **B)** Histogram representing the distribution of NeuroD1 signal (silver grains/cell \pm S.E.M.) in ACTH-positive cells and other cells. Grain counts represent the average of about 150 cells. **C)** Localization of NeuroD1-positive cells by *in situ* hybridization (arrowhead) and of TSH β -positive cells by immunohistochemistry using anti-TSH β antiserum on consecutive sections of the same pituitary as shown in A. **D)** Silver grain counts of experiment shown in C.

II.4.6 NeuroD1 synergizes with Ptx1, a pituitary-restricted homeodomain transcription factor.

We previously showed that two regulatory elements of the POMC promoter, DE2C and CE3, exert corticotroph-specific synergism in AtT-20 cells and not in GH3 or in L cells (Therrien and Drouin, 1993). This synergy likely depends on two transcription factors: Ptx1 acting on the CE3 element and NeuroD1-containing heterodimers acting on the DE2C E-box. In order to assess the dependence on bHLH factors for DE2C-dependent synergism in AtT-20 cells, we used the dominant negative bHLH factor Id (Benezra et al., 1990). Overexpression of Id blunted the activity of a DE2C-containing reporter but not that of reporters containing only the Ptx1 target site CE3 (Fig. II.8A), in agreement with a model of NeuroD1 heterodimers acting on DE2C and with previous data showing blockade of CUTE DNA binding activity by Id (Therrien and Drouin, 1993).

In order to test directly whether this synergism depends on NeuroD1 and Ptx1, we reconstituted their interaction in heterologous cells. Using the CE3 and DE2 reporter illustrated in Figure 8A, it was found that expression of NeuroD1/Pan1 and Ptx1 results in synergistic activation (Fig. II.8B, lane 6 compared to lanes 2 and 5). Either bHLH factor alone had no effect (lanes 3 and 4) in agreement with previous data (Fig. II.2A). Unrelated promoters like RSV did not show this synergistic response (data not shown). Consistent with previous data (Fig. II.8A and ref. (Therrien and Drouin, 1993), overexpression of Id reversed the synergistic activity of NeuroD1/Pan1 and Ptx1 (lane 7). Interestingly, overexpression of Pan1 alone exhibited moderate synergism in the presence of Ptx1 (lanes 8 and 9), but not NeuroD1 (lane 10). These data suggest that the synergistic interaction between Ptx1 and the bHLH heterodimers is mediated through the Pan1 moiety. Taken together, these data indicate that transcription synergism between factors of two different structural families of DNA-binding proteins, a homeodomain and a bHLH factor, may form the basis for cell-specific activation of the POMC gene.

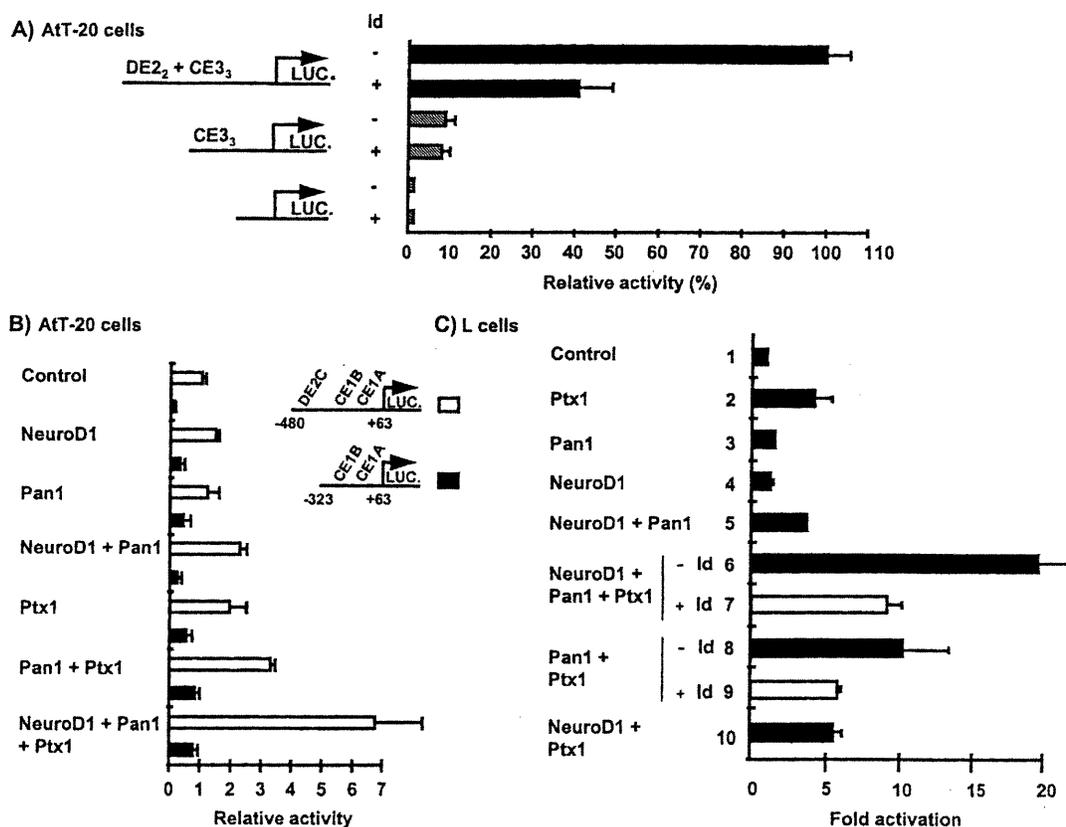


Figure II.8 Reconstitution of NeuroD1 synergism with Ptx1. **A)** In NeuroD1 and Ptx1-expressing AtT-20 cells, both targets for NeuroD1 (DE2) and Ptx1 (CE3) are required for bHLH-dependent activity as demonstrated by Id overexpression. Data represent the average \pm S.E.M. of at least three experiments, each performed in duplicate. **B)** Reconstitution of NeuroD1 synergism with Ptx1 in heterologous cells (L). The DE2/CE3 reporter illustrated above in A was co-transfected with expression vectors for the indicated factors. Ptx1 was described previously (Lamonerie et al., 1996). Data represent the average \pm S.D. of two experiments each performed in duplicate.

II.5. Discussion

We have reported that the bHLH factor NeuroD1 is expressed in a subset of pituitary cells and that it contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. NeuroD1 heterodimers present in corticotroph cell of the pituitary and in AtT-20 cells, specifically activate transcription from one E-box of the POMC promoter, the DE2C E-box, and discriminates this E-box from other E-boxes that are the target of class 1 ubiquitous bHLH factors. Interestingly, NeuroD1-containing heterodimers exhibit transcriptional synergism with Ptx1, a *bicoid*-related homeodomain protein. The joint action of the two factors in the pituitary corticotroph lineage may constitute the basis of a combinatorial usage of transcription factors with developmentally restricted patterns of expression in order to support cell-specific transcription programs and to drive cell differentiation during pituitary development.

II.5.1 Specific activation of the DE2C E-box.

Both *in vivo* (transfection assays) and *in vitro* (EMSA) experiments have demonstrated that NeuroD1/Pan1 heterodimers discriminate the DE2C E-box from others (Fig. II.2 and II.3). This specificity was previously attributed to the CUTE complexes which are now shown to be NeuroD1 heterodimers (Fig. II.4 and II.5). bHLH factors interact with target sequences related to NCANNTGN (Murre et al., 1989b). Previous work had identified specific DE2C residues that differentiate it from the CE1B and CE1A E-boxes of the POMC promoter and that are likely sites of NeuroD1-specific interactions (Therrien and Drouin, 1993). On the basis of previous studies on MyoD, the recognition of the central N residues is highly dependent on lysine¹²² situated in the junction region between the basic and HLH domains (Ma et al., 1994; Davis and Weintraub, 1992; Davis et al., 1990). NeuroD1 has a methionine at the same position instead of the lysine; this is characteristic of a subfamily of class II bHLH factors related to *Drosophila atonal* (Lee et al., 1995). This methionine is likely involved in discrimination of the central nucleotides of the POMC E-boxes. In particular, it may prevent

recognition of the CE1B E-box by NeuroD1/Pan1 heterodimers (Fig. II.2 B). Interestingly, the central nucleotides of CE1A are the same as DE2C. However, previous work in our laboratory demonstrated that the CE1A E-box which differs only from DE2C by a T instead of C at the 3' end of the E-box is almost inactive (Therrien and Drouin, 1993). Conversely, mutagenesis of this 3' nucleotide of DE2C from C to T completely abolished its activity and decreased its *in vitro* DNA binding to CUTE complexes by at least 3-fold (Therrien and Drouin, 1993). This discrimination was explained by a putative steric clash caused by a T at this position (Ellenberger et al., 1994). This is in agreement with other studies that showed dependence on similar flanking residues for MyoD, Myc, and PHO4 (Blackwell and Weintraub, 1990; Sun and Baltimore, 1991; Fisher and Goding, 1992). In fact, CE1A was not a good target for class I bHLH factors nor for NeuroD1/Pan1 heterodimers (Fig. II.2C). Specificity of NeuroD1 heterodimer recognition therefore relies as much on the central variant nucleotides as it does on the flanking residues.

II.5.2 CUTE is formed of NeuroD1 heterodimers.

NeuroD1 does not form active homodimers (Naya et al., 1995). Using two different antibodies against NeuroD1 (Fig. II.4 and II.6), we have shown that NeuroD1 is present in both bands of the CUTE complexes of AtT-20 cells. These complexes must be heterodimers and we have shown that they could be formed with class I bHLH factors like E2A, ITF-2 and ME1 (Fig. II.5B and C). All the NeuroD1 heterodimers tested had similar transactivation potential (Fig. II.5B). It appears that NeuroD1/E2A heterodimers account for about 25% of the CUTE complexes (half of the upper band, Fig. II.5A). Since only 50% of the upper CUTE complex is supershifted in conditions that did not appear to be limiting, we conclude that this band contains E2A gene products and other class I bHLH factors. The identity of the NeuroD1 partner in the lower CUTE complexes is still unknown, although it was previously shown that both complexes have the same DNA binding specificity (Therrien and Drouin, 1993). To verify if specific modification(s) of the class I bHLH factors might take place in AtT-20 cells and account for the faster migration of the lower CUTE complexes, we over-

expressed these factors in AtT-20 cells and found that none of them could account for the faster CUTE complexes (data not shown). Formally, it might be possible that the lower CUTE complexes contain a splicing variant of NeuroD1 which is unique to AtT-20 cells and therefore not observed in overexpression experiments in L cells (Fig. II.4); however, this is not very likely as in such case, one might expect half of these faster migrating complexes to also contain E2A gene products. Interestingly, NeuroD1 is expressed in HIT (hamster insulinoma tumor) cells, and its complexes with DE2C co-migrated with the upper CUTE complexes, and not with the lower (Therrien and Drouin, 1993). Taken together, these data suggest that a class I-type bHLH factor different from the ones we tested in this work, might be expressed in AtT-20 cells. This unidentified factor would produce the faster migrating CUTE complexes as heterodimers with NeuroD1.

II.5.3 NeuroD1 expression in pituitary.

NeuroD1 is expressed in the nervous system and in α and β cell-derived lines of the pancreas (Naya et al., 1995). It is also expressed in enteroendocrine secretin cells (Mutoh et al., 1997). We now show that NeuroD1 is also expressed in a subset of pituitary cells (Fig. II.7). These are predominantly the POMC-expressing corticotroph cells. However, the sensitivity of the *in situ* hybridization is such that it may not reveal low level expression in other cells. The analysis of pituitary-derived cell lines has confirmed NeuroD1 expression in a model corticotroph line, the AtT-20 cells (Fig. II.4 and II.6) but not in cells of the somatolactotroph lineage, the GH3 cells (Boockfor and Schwarz, 1988) (Fig. II.6A and B). The absence of NeuroD1 signal in TSH β -positive pituitary cells (Fig. II.7C and D) was also confirmed by Northern blot analysis of RNA from the α TSH (Akerblom et al., 1990) cell line (data not shown). In contrast, NeuroD1-related DNA binding activity was detected in α T3 (Windle et al., 1990) cell extracts, a model of gonadotroph cells (Fig. II.6A), and NeuroD1 expression was confirmed by Northern blot (Fig. II.6B lane 2). Thus, NeuroD1 might be expressed below *in situ* detection in adult pituitary gonadotrophs; alternatively,

the α T3 might be representative of a fetal differentiation intermediate of the gonadotroph lineage and NeuroD1 expression might be temporally limited in this lineage during pituitary development.

Two types of POMC-expressing cells are present in the pituitary, the corticotroph and the melanotroph cells. No expression of NeuroD1 is seen in the intermediate lobe melanotroph cells (data not shown), indicating that NeuroD1 is not a marker of all POMC-expressing cells. This observation is strongly supportive of the conclusion that different transcriptional regulatory mechanisms are operative in the two POMC-expressing lineages. NeuroD1 is thus a marker of corticotroph cells and could be useful to differentiate melanotroph from corticotroph cells, either during ontogeny or in human pituitary tumors.

II.5.4 NeuroD1 synergism with the homeobox factor Ptx1.

We have previously documented the central role played by the NeuroD1 target sequence DE2C and the Ptx1 target sequence CE3 for cell-specific transcription of POMC (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993; Lamonerie et al., 1996). Formal promoter analysis had predicted that an interaction between NeuroD1 and Ptx1 might form the scaffold upon which other transcription factors get involved in POMC transcription. We now provide data showing transcriptional synergism between NeuroD1 heterodimers and Ptx1 (Fig. II.8B). This interaction was reconstituted in cells that express neither factor and its dependence on the bHLH dimers was supported by interference with the bHLH dominant negative Id. It had previously been shown that the CUTE complexes are disrupted by Id (Therrien and Drouin, 1993), presumably by competing potential partners. Similar dependence of the POMC promoter on bHLH activity was shown in AtT-20 cells (Fig. II.8A and (Therrien and Drouin, 1993). Synergism between bHLH and homeobox-containing factors was observed on the insulin promoter. Indeed, the lim-homeodomain factor *Imx-1* was shown to synergize with dimers of Pan1 and their interaction was dependent on the lim domain (German et al., 1992). Pan1 was also reported to activate transcription synergistically with another homeobox factor, STF-1 (Pdx1, IPF-1)

in the same system (Peers et al., 1994). These experiments were performed before the cloning of NeuroD1/BETA2: if Pan1/NeuroD1 heterodimers are the active bHLH factors in β cells, we must conclude that Pan1 is the most likely interaction partner of the homeobox factor(s). Our data support the model that NeuroD1 heterodimers interact with Ptx1 through the class I bHLH moiety of the dimers, as suggested by the small synergism between Ptx1 and Pan1 (without NeuroD1, Fig. II.8B lane 8). Since Pan1 did not have any activity on its own (lane 3), it is possible that the Pan1 effect is due to its recruitment by protein:protein interaction with Ptx1; similar interactions were proposed between MyoD and MEF2A (Molkentin et al., 1995). Thus, it appears that NeuroD1 confers E-box selectivity to the heterodimers and that the ability to synergize with Ptx1 or other homeobox factors (like *Imx-1* or *STF-1*) might be a property conferred by a class I bHLH partner like Pan1.

II.5.5 Putative role of NeuroD1 in the pituitary.

NeuroD1 has a highly restricted pattern of expression: it is only expressed in the nervous system and in a subset of pancreatic and pituitary endocrine cells. Together with other neurogenic, bHLH factors like *MASH-1*, neurogenin and *HES-1*, NeuroD1 (and its related factors *NeuroD2* and *NeuroD3*) may constitute a developmental code in which each factor play a role at specific times or/and places during neural development (Ma et al., 1996; Guillemot et al., 1993; Ishibashi et al., 1995; Ishibashi et al., 1994; McCormick et al., 1996). These factors may have different functions, either in pattern formation, in cell commitment or differentiation. The current data on NeuroD1 function in *Xenopus* is rather in support of a role in cell differentiation during the later stages of neurogenesis (Lee et al., 1995). The expression of NeuroD1 in a limited subset of pituitary cells suggests that NeuroD1 might play a similar role in pituitary lineage differentiation in addition to its role as transcription factor. In particular, the high level NeuroD1 expression in corticotroph cells, both in pituitary (Fig. II.7A and B) and AtT-20 cells (Fig. II.3) is suggestive of a function in this lineage. The only other lineage for which some expression was detected is the

gonadotroph model α T3 cells (Fig. II.6); however, the α T3 cells also express other factors (as yet unidentified) with related DNA-binding specificity. Thus, the corticotrophs might be unique in the pituitary by their exclusive (of other bHLH) expression of NeuroD1. The synergistic action of NeuroD1 with Ptx1 and their joint expression in corticotrophs may form the basis of a combinatorial code for specification of this lineage.

In conclusion, we have shown that NeuroD1 is an essential determinant for the transcriptional specificity of the DE2C element of the POMC promoter. This specificity appears to be conferred by selective E-box recognition. Further, we have shown that the transcriptional activity of NeuroD1/Pan1 heterodimers is enhanced by interaction with a homeobox factor, Ptx1, that has a restricted pituitary pattern of expression. Taken together, these data support the model of a combinatorial action of transcription factors during pituitary development.

II.6. Acknowledgment

We are grateful to Ming Tsai (Baylor, College of Medicine, Houston), Chris Nelson (Tularick), Toomas Neuman (Colorado State University, Fort Collins), Scott McDonald and François Guillemot (Strasbourg FRANCE) for gift of plasmids encoding hamster NeuroD1 and Pan1/2, mouse ME1a/b, ITF2, and NeuroD1, respectively. We are also grateful to Ming Tsai for the generous gift of NeuroD antiserum and to Dr. A.F. Parlow, Pituitary Hormones and Antisera Center, Torrance CA for antisera against rat TSH β . The expert advice of Christian Lanctôt was helpful in developing *in situ* hybridization and immunohistochemistry, and we thank Michel Chamberland for oligonucleotide synthesis. The expert secretarial assistance of Lise Laroche was greatly appreciated. This work was funded by a grant from the National Cancer Institute of Canada with funds provided by Canadian Cancer Society.

II.7. References

Akerblom, I.E., Ridgway, E.C., and Mellon, P.L. (1990). An alpha-subunit-secreting cell line derived from a mouse thyrotrope tumor. *Mol. Endocrinol.* *4*, 589-596.

Andersen, B. and Rosenfeld, M.G. (1994). Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. A model for transcriptional regulation of cell phenotypes in mammalian organogenesis. *J. Biol. Chem.* *269*, 29335-29338.

Aplan, P.D., Nakahara, K., Orkin, S.H., and Kirsch, I.R. (1992). The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J.* *11*, 4073-4081.

Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* *61*, 49-59.

Blackwell, T.K. and Weintraub, H. (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* *250*, 1104-1110.

Boockfor, F.R. and Schwarz, L.K. (1988). Cultures of GH3 cells contain both single and dual hormone secretors. *Endocrinology* *122*, 762-764.

Chiaramello, A., Neuman, K., Palm, K., Metsis, M., and Neuman, T. (1995). Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75LNGFR gene. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6036-6044.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform-extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156-159.

- Cordle, S.R., Henderson, E., Masuoka, H., Weil, P.A., and Stein, R. (1991). Pancreatic beta-cell-type-specific transcription of the insulin gene is mediated by basic helix-loop-helix DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1734-1738.
- Davis, R.L., Cheng, P.-F., Lassar, A.B., and Weintraub, H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60, 733-746.
- Davis, R.L. and Weintraub, H. (1992). Acquisition of myogenic specificity by replacement of three amino acid residues from MyoD into E12. *Science* 256, 1027-1030.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., and Harrison, S.C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* 8, 970-980.
- Fisher, F. and Goding, C.R. (1992). Single amino acid substitutions alter helix-loop-helix protein specificity for bases flanking the core CANNTG motif. *EMBO J.* 11, 4103-4109.
- German, M.S., Wang, J., Chadwick, R.B., and Rutter, W.J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.* 6, 2165-2176.
- Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., and Joyner, A.L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.
- Hasty, P., Bradley, A., Hsi Morris, J., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N., and Klein, W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501-506.

Henthorn,P., McCarrick-Walmsley,R., and Kadesch,T. (1990). Sequence of the cDNA encoding ITF-1, a positive-acting transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 18, 677.

Ishibashi,M., Ang,S.L., Shiota,K., Nakanishi,S., Kageyama,R., and Guillemot,F. (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop- helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.* 9, 3136-3148.

Ishibashi,M., Moriyoshi,K., Sasai,Y., Shiota,K., Nakanishi,S., and Kageyama,R. (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J.* 13, 1799-1805.

Japon,M.A., Rubinstein,M., and Low,M.J. (1994). In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1117-1125.

Jeannotte,L., Trifiro,M.A., Plante,R.K., Chamberland,M., and Drouin,J. (1987). Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4058-4064.

Kageyama,R., Sasai,Y., Akazawa,C., Ishibashi,M., Takebayashi,K., Shimizu,C., Tomita,K., and Nakanishi,S. (1995). Regulation of mammalian neural development by helix-loop-helix transcription factors. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9, 177-188.

Karlsson,O., Edlund,T., Moss,J.B., Rutter,W.J., and Walker,M.D. (1987). A mutational analysis of the insulin gene transcription control region: expression in beta cells is dependent on two related sequences within the enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8819-8823.

- Kawamura,K. and Kikuyama,S. (1992). Evidence that hypophysis and hypothalamus constitute a single entity from the primary stage of histogenesis. *Development* 115, 1-9.
- Kawamura,K. and Kikuyama,S. (1995). Induction from posterior hypothalamus is essential for the development of the pituitary proopiomelanocortin (POMC) cells of the toad (*Bufo japonicus*). *Cell Tissue Res.* 279, 233-239.
- Kikuyama,S., Inaco,H., Jenks,B.G., and Kawamura,K. (1993). Development of the ectopically transplanted primordium of epithelial hypophysis (anterior neural ridge) in *Bufo japonicus* embryos. *J. Exp. Zool.* 266 , 216-220.
- Lamonerie,T., Tremblay,J.J., Lanctôt,C., Therrien,M., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1996). PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* 10, 1284-1295.
- Lanctôt,C., Lamolet,B., and Drouin,J. (1997). The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124, 2807-2817.
- Lassar,A.B., Davis,R.L., Wright,W.E., Kadesch,T., Murre,C., Voronova,A., Baltimore,D., and Weintraub,H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315.
- Lee,J.E., Hollenberg,S.M., Snider,L., Turner,D.L., Lipnick,N., and Weintraub,H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.
- Ma,P.C., Rould,M.A., Weintraub,H., and Pabo,C.O. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-459.

Ma, Q.F., Kintner, C., and Anderson, D.J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

Mccormick, M.B., Tamimi, R.M., Snider, L., Asakura, A., Bergstrom, D., and Tapscott, S.J. (1996). NeuroD2 and NeuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the NeuroD gene family. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5792-5800.

McDonald, S., Poulin, G., Lamonerie, T., Therrien, M., and Drouin, J. (1996). HLH transcription factors act at multiple sites to control POMC gene expression. Submitted.

Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83, 1125-1136.

Murre, C., McCaw, P.S., and Baltimore, D. (1989a). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., and Baltimore, D. (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.

Mutoh, H., Fung, B.P., Naya, F.J., Tsai, M.J., Nishitani, J., and Leiter, A.B. (1997). The basic helix-loop-helix transcription factor beta2/neurod is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3560-3564.

Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., and Nonaka, I. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364, 532-535.

Naya, F.J., Stellrecht, C.M.M., and Tsai, M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* 9, 1009-1019.

Nelson, C., Shen, L.P., Meister, A., Fodor, E., and Rutter, W.J. (1990). Pan: a transcriptional regulator that binds chymotrypsin, insulin, and AP-4 enhancer motifs. *Genes Dev.* 4, 1035-1043.

Nordeen, S.K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *BioTechniques* 6, 454-456.

Olson, E.N. and Klein, W.H. (1994). bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* 8, 1-8.

Peers, B., Leonard, J., Sharma, S., Teitelman, G., and Montminy, M.R. (1994). Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol. Endocrinol.* 8, 1798-1806.

Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.

Schwind, J. (1928). The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am. J. Anat.* 41, 295-319.

Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.

Sun,X.-H. and Baltimore,D. (1991). An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64, 459-470.

Therrien,M. and Drouin,J. (1991). Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3492-3503.

Therrien,M. and Drouin,J. (1993). Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2342-2353.

Voss,J.W. and Rosenfeld,M.G. (1992). Anterior pituitary development: short tales from dwarf mice. *Cell* 70, 527-530.

Weintraub,H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.

Windle,J.J., Weiner,R.I., and Mellon,P.L. (1990). Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 4, 597-603.

Zhang,W., Behringer,R.R., and Olson,E.N. (1995). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up- regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev.* 9, 1388-1399.

Chapitre III

Specific protein:protein interaction between bHLH transcription factors and homeoprotein of the Pitx family

Article publié

Molecular and Cellular Biology, July 2000, vol20, No13, pp 4826-4837

Gino Poulin, Mélanie Lebel, Michel Chamberland,

Francois W. Paradis and Jacques Drouin

Laboratoire de génétique moléculaire

Institut de recherches cliniques de Montréal

110 des Pins Ouest

Montréal Québec Canada H2W 1R

III.1. Abstract

Homeoproteins and bHLH transcription factors are known for their critical role in development and cellular differentiation. The pituitary POMC gene is a target for factors of both families. Indeed, pituitary-specific transcription of POMC depends on the action of the homeodomain-containing transcription factor Pitx1 and of bHLH heterodimers containing NeuroD1. We now show lineage-restricted expression of NeuroD1 in pituitary corticotroph cells and a direct physical interaction between bHLH heterodimers and Pitx1 that results in transcriptional synergism. The interaction between the bHLH and homeo domains is restricted to ubiquitous (class A) bHLH and to the Pitx subfamily. Since bHLH heterodimers interact with Pitx factors through their ubiquitous moiety, this mechanism may be implicated in other developmental processes involving bHLH factors like neurogenesis and myogenesis

III.2. Introduction

Cell-specific transcription results from complex molecular interactions that involve the synergistic action of multiple transcription factors. Taken together, these interactions provide the molecular basis for the complex program of cell differentiation and development. Factors of two classes of transcription factors often involved in developmental processes, the homeodomain (HD) and the basic helix-loop-helix (bHLH) factors, were found to form the basis for cell-specific transcription of pituitary pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression. We have used this system to define the molecular mechanism by which these two classes of transcription factors can synergistically interact to control transcription. More specifically, our studies reveal a specific interaction between the HD of the Pitx (Ptx) subfamily of homeobox proteins and the widely expressed class A bHLH transcription factors.

The HD is a 60 amino acids DNA binding domain that contains a well-conserved helix-turn-helix motif. The third helix of this motif interacts with the major groove of DNA and it is responsible for sequence-specific recognition. In particular, residue 50 of the HD is responsible for sub-dividing the HD-containing genes into large subgroups (Duboule, 1994). HD proteins related to *Drosophila bicoid* have a lysine at this position, and this residue dictates recognition of a unique DNA sequence (Hanes and Brent, 1989; Treisman et al., 1989). In vertebrates, this subgroup includes the *gooseoid*, Otx and Pitx (Ptx) subfamilies (Drouin et al., 1998a; Gage et al., 1999). While Pitx1 was originally cloned as a pituitary transcription factor (Lamonerie et al., 1996; Szeto et al., 1996) that is involved in transcription of many pituitary hormone genes (Tremblay et al., 1998), it was later found to play a wide role during early development in agreement with its early expression in posterior lateral plate mesoderm and in the stomodeum (Lancôt et al., 1997). Indeed, inactivation of the Pitx1 gene impairs hindlimb and mandible development (Lancôt et al., 1999; Szeto et al., 1999). In the stomodeum, Rathke's pouch and definitive pituitary, Pitx1 is coexpressed with the related Pitx2 gene and it is likely that the two genes serve partly redundant

functions in these tissues (Lanctôt et al., 1997; Gage and Camper, 1997; Mucchielli et al., 1996). Pitx2 was first isolated as the causative gene for Rieger's syndrome (Semina et al., 1996), a craniofacial malformation that affects facial and tooth development; it was later found to be expressed in left lateral plate mesoderm and to be the effector for left-right asymmetry in development of internal organs (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999). In addition to its left side specific expression in lateral plate mesoderm, Pitx2 is also expressed bilaterally in the head and branchial arches, as well as in the myotome and in migrating myoblasts of the limbs (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998).

Whereas HD-containing genes have mostly been implicated in patterning (Krumlauf, 1994) like Pitx1 for specification of hindlimbs (Lanctôt et al., 1999; Szeto et al., 1999; Weatherbee and Carroll, 1999; Graham and McGonnell, 1999) and Pitx2 in determination of laterality (Harvey, 1998), bHLH transcription factors have been more often implicated in cell differentiation. Indeed, the four myogenic bHLH factors play critical roles at different stages of muscle cell differentiation (Olson and Klein, 1994; Rawls and Olson, 1997) and other bHLH are involved in hematopoietic differentiation (Aplan et al., 1992; Shivdasani et al., 1995) or in neurogenesis (Guillemot and Joyner, 1993; Guillemot et al., 1993; Ma et al., 1996; Lee et al., 1995; Lee, 1997). bHLH factors are characterized by a helix-loop-helix dimerization domain and a basic domain that binds specific DNA sequences (NCANNTGN) called E boxes (Murre et al., 1989; Ma et al., 1994). The bHLH family can be sub-divided into various subgroups (Hollenberg et al., 1995). The class A bHLH are ubiquitously expressed and they appear to act primarily as general transcription factors although they play a particular role for B lymphocyte development (Zhuang et al., 1994). The class A bHLH can form homodimers (Sun and Baltimore, 1991) but they also form heterodimers with class B bHLH transcription factors (Lassar et al., 1991). Different bHLH dimers interact with specific E boxes that differ in their non-conserved residues (Blackwell and Weintraub, 1990). The class B bHLH have a tissue- or cell-restricted expression and many members of these groups are critical for

differentiation in various lineages like muscle (Olson and Klein, 1994), the erythroid lineage (Shivdasani et al., 1995) and for neuronal differentiation (Lee, 1997).

One neurogenic bHLH, NeuroD1/BETA2 (Lee et al., 1995; Naya et al., 1995) was also shown to be important for development of endocrine cells in pancreas and of secretin and cholecystokinin cells in the intestine (Mutoh et al., 1997). In neural tissues, NeuroD1 has been associated with the late differentiation events (Lee et al., 1995) and in mice, it is expressed in neurons of cranial nerves (V to XI), dorsal root ganglia, cerebral cortex, nasal epithelium, vomeronasal organ and retina of the eye. Its expression is transient in cranial nerves and dorsal root ganglia, but persistent in the other structures. It is also excluded from the mitotically active ventricular zone of the cerebral cortex and spinal cord. Neurogenin 1 and 2 are bHLH factors that precede and cause NeuroD1 expression in *Xenopus* (Ma et al., 1996) and mice (Ma et al., 1999). It was suggested that neurogenins and NeuroD1 may act as determination and differentiation factors, respectively. They are part of a proneural gene cascade that is similar to the cascade of myogenic bHLH.

NeuroD1 is also found in endocrine cells of the pancreas and inactivation of its gene causes a diabetic phenotype due to a failure to develop mature islets (Naya et al., 1997). By analogy with the nervous system, NeuroD1 expression is preceded by, and requires neurogenin 3 in pancreas (Apelqvist et al., 1999; Gradwohl et al., 2000). In this tissue, NeuroD1 containing heterodimers are required for transcription of the insulin gene and their action on this promoter depends on interaction with a pancreas-specific homeoprotein, Pdx1 (Peers et al., 1994; Peshavaria et al., 1997). Very recently, it was suggested that these factors interact physically with each other (Ohneda et al., 2000).

We have previously shown expression of NeuroD1 in adult pituitary corticotroph cells and we have documented its role for corticotroph-specific transcription of the POMC gene (Poulin et al., 1997). We have also shown the importance of the Pitx1 transcription factor for expression of POMC (Lamonerie et al., 1996). Interestingly, the action of NeuroD1-containing bHLH dimers on

POMC transcription is entirely dependent on transcriptional interaction with Pitx1 (Therrien and Drouin, 1993; Poulin et al., 1997). However, the molecular basis of this interaction is unknown. Here we present evidence of direct physical interaction between the DNA binding domains of bHLH and HD transcription factors, and suggest that this interaction may account for the transcriptional synergism observed between them. The specificity of this interaction which is restricted to the Pitx family and the class A ubiquitous bHLH suggests that the mechanism revealed in the present work might be involved in other differentiated tissues where the Pitx genes are co-expressed with bHLH factors like muscle and neurons.

III.3. Materials and methods

III.3.1 Plasmids and oligonucleotides.

Reporter plasmids were constructed in the pXP1-luciferase vector as described previously (Poulin et al., 1997). The simplified reporter plasmids were made of oligonucleotide sequences of the corresponding regions of the rat POMC promoter as described (Poulin et al., 1997). Point mutations were made using the pALTER system from Promega. The oligonucleotide sequences used for mut E box_{neuro}, mut Pitx1 site and E box_{neuro} ⇒ E box_{ubi} are respectively GCCAGGAAGGCT**ACCGG**ACGCACACAGG, CACACCAGGATT**AGACTACTCTGTCCAGT** and GCCAGGAAG**CCAGGTGTGCGC**ACACAGG (bolded characters are the mutated nucleotides). Expression vectors used were described in previous work (Poulin et al., 1997).

III.3.2 Transfection assays.

L or AtT-20 D16v cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum and maintained at 37°C and 5% CO₂. L cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation method. 50 000 cells were plated in 12 well plates. 8 µg total DNA was used for each transfection performed in duplicate. Control experiments contained equivalent amounts of empty expression vector or pSP64. AtT-20 cells were transfected by using Lipofectamine (Pharmacia). Briefly, 250 000 cells were plated in 12 well plates. 3 µg total DNA was used for each transfection performed in duplicate. Harvesting and luciferase analysis were described previously (Lamonerie et al., 1996; Poulin et al., 1997).

III.3.3 Co-immunoprecipitation.

250 000 COS-1 cells were transfected in 60mm dish with the appropriate expressing vectors (5 μ g) for a total of 15 μ g of DNA. The cells were harvested and then centrifuged and resuspended in 800 μ l of buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1mM DTT and 10 μ g/ml of each of the protease inhibitors, leupeptin, aprotinin and pepstatin). Cells were incubated on ice for 15 minutes before addition of 50 μ l NP-40 followed by vigorous vortexing. After centrifugation, the nuclear pellet was resuspended in 100 μ l of buffer B (10 mM HEPES pH 7.9, 0.1 mM EGTA, 0.4 M NaCl, 0,5 mM PMSF, 1mM DTT, and 10 μ g/ml of each protease inhibitor as above) and shaken vigorously at 4°C for 15 minutes. The extract was then centrifuged and the supernatant dialyzed against 500mL of buffer C (10 mM Tris pH7.9, 150 mM NaCl, 0.3% NP-40, 0.25% BSA, 1mM DTT, 0.01M NaN₃) at 4°C with four changes of buffer every 2 hours. Protein concentration of the extracts was estimated by Bradford assay. Co-immunoprecipitation experiments were performed essentially as described (Durocher et al., 1997), except that 10 μ g of transfected COS-1 or 200 μ g of untransfected AtT-20 cell nuclear extracts were used and subjected to a pre-clear step using 1 μ g of purified IgG from rabbit (Sigma). 0.1 μ g of anti-Pitx1a antibody affinity purified was used for immunoprecipitation. Pan1 was revealed by Western blotting using an anti-E2A antibody (Santa Cruz) and an anti-mouse-horseradish peroxidase (Sigma). Revelation was performed by chemiluminescence as described by the manufacturer (ECL+plus, Amersham Pharmacia).

III.3.4 Transgenic mice.

The plasmids used in transgenic mice were previously described (Therrien and Drouin, 1993). The injected fragments were produced by BamHI-XmnI digests and were purified by agarose gel. Transgenic mice were produced by injection of DNA fragments

in eggs from C3H mice. Implantation was done in pseudo-pregnant CD1 mice. POMC-Luciferase transgenes were identified by Southern blot and mice heterozygote for the transgene were sacrificed for analysis. Anterior and intermediate pituitaries were dissected, immediately frozen on dry ice and then homogenized in 200 to 300 μ l of a Tris-HCl pH 8, Np-40 0.5% and DTT 0.1M buffer. After centrifugation (5 min), half of the supernatant was analyzed for luciferase activity and the other half used for protein quantification using the Bradford assay.

III.3.5 Antibody against NeuroD1 and immunohistochemistry.

A PCR fragment encoding amino acids 122 to 165 of mouse NeuroD1 was sub-cloned in frame with MBP and GST into their respective vectors. The fusion proteins were purified from *Escherichia coli* BL-21 according to the maltose and sepharose beads manufacturer's recommendations (New England Biolabs and Pharmacia Biotech, respectively). Antibodies were raised by injection of 100 μ g of MBP-NeuroD1₁₂₂₋₁₆₅ in New Zealand female rabbits; two booster injections were made at 4 and 6 weeks after the control injection. After assessment of immunological response by Western blot, the rabbits were sacrificed and serum collected. The anti-serum was purified on a GST-NeuroD1₁₂₂₋₁₆₅ column to obtain an affinity-purified antibody preparation. Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin embedded and sectioned sagittally in 5mm slices. Immunohistochemistry was performed as previously described (Poulin et al., 1997; Raphael et al., 1995) except that an amplification step was added using the Renaissance Thyramide Signal Amplification (TSA)-indirect system from NEN.

III.3.6 Pull-down assay.

MBP-LacZ, MBP-Pitx1, MBP-Nkx2.5, MBP-Gsc and MBP-Pitx1 deletion mutants were purified from *Escherichia coli* BL-21 were following manufacturer's recommendations. 500ng of each fusion protein coupled to the amylose beads (New

England Biolabs) was used in all assays. Pan1, NeuroD1 and luciferase were synthesized *in vitro* using S³⁵-methionine and the TNT-coupled transcription/translation rabbit reticulocyte lysate system (Promega). Pull-downs were performed as described (Durocher et al., 1997)

III.4. Results

III.4.1 Transcriptional synergism between Pitx1 and NeuroD1 requires the E box_{neuro} but not NeuroD1 *per se*.

We have previously demonstrated that corticotroph specificity of POMC transcription (Fig. III.1A) depends on the action of a homeoprotein, Pitx1, and of bHLH heterodimers containing NeuroD1 (Lamonerie et al., 1996; Poulin et al., 1997). The transcriptional synergism between these factors was reconstituted in L cell fibroblasts using simple reporters containing Pitx1 binding sites and the NeuroD1-specific E box, E box_{neuro} (Fig. III.1B). We tested whether both binding sites are required for synergism in this simple system, and found that the E box_{neuro} is essential (Fig. III.1C) whereas the Pitx1 binding site is not (Fig. III.1D). Thus, DNA-bound bHLH heterodimers containing NeuroD1 and Pan1 can recruit Pitx1 to the promoter but not the reverse.

Since the POMC promoter contains two different E boxes as well as one Pitx1 binding site (Poulin et al., 1997; Lamonerie et al., 1996), we investigated their respective roles in the intact promoter (Fig. III.1E, POMC-480). Previous work had shown the bipartite organization of the upstream 300 bp of the POMC promoter (Therrien and Drouin, 1991) and the importance of the distal E box (E box_{neuro}, previously called DE2C) for activity of its distal half (Therrien and Drouin, 1993). In agreement with these observations, mutagenesis of the E box_{neuro} decreased promoter activity in POMC-expressing AtT-20 cells (Fig. III.1E, Mut E box_{neuro}) to the same extent as deletion of the distal promoter sequences (Fig. III.1E, POMC-323).

In contrast to the simple reporter used in Fig. III.1, mutagenesis of the Pitx1 binding site of the intact POMC promoter had a similar effect on activity as mutation of E box_{neuro} (Fig. III.1E, Mut Pitx site). Thus, promoter context imposes constraints on transcription factor activity that are not mimicked in simplified reporters containing multimerized regulatory elements. In this case, the E box_{neuro} in its natural context is not sufficient to recruit Pitx1 in absence of the Pitx1 binding site. We have previously shown that another E box of the POMC promoter, E box_{ubi} (CE1B), is activated upon binding of Pan1 (the rodent homologue of E47) or other ubiquitous bHLH factors in contrast to the E box_{neuro} which is only activated upon binding of NeuroD1/Pan1 heterodimers; the E box_{ubi} itself is not bound or activated by NeuroD1/Pan1 heterodimers (Poulin et al., 1997). In order to test the importance of NeuroD1 for activity of the distal E box, we mutated this E box into an E box_{ubi} that no longer requires NeuroD1 for DNA binding and transcriptional activation (Poulin et al., 1997). This mutant promoter (Fig. III.1E, Mut E box_{neuro} \Rightarrow E box_{ubi}) is as active as the intact promoter, suggesting: 1) that NeuroD1 per se is not essential for synergism with Pitx1, 2) that it can be replaced by Pan1, and 3) that the role of NeuroD1 is to confer sequence-specific recognition.

In agreement with the importance of the distal E box_{neuro} for promoter activity in cell culture (Fig. III.1E), anterior pituitary expression of a POMC-luciferase transgene deleted of its distal sequences was found to be at least 1 000 times less active than a transgene driven by the intact POMC promoter (Fig. III.2A). This may even constitute an underestimate of the activity of the deleted sequences since five out of seven POMC₋₃₂₃-luc lines tested did not express the transgene at detectable levels; in contrast, the POMC₋₄₈₀-luc transgene was expressed in four of five lines tested. This great *in vivo* dependence on distal promoter sequences (by comparison to activity in cultured cells) was also observed in the intermediate pituitary (Fig. III.2B). Thus, the distal POMC promoter plays a critical role for pituitary expression; prior work had indicated that the activity of this promoter domain absolutely requires an active E box_{neuro} (Therrien and Drouin, 1993; Poulin et al., 1997).

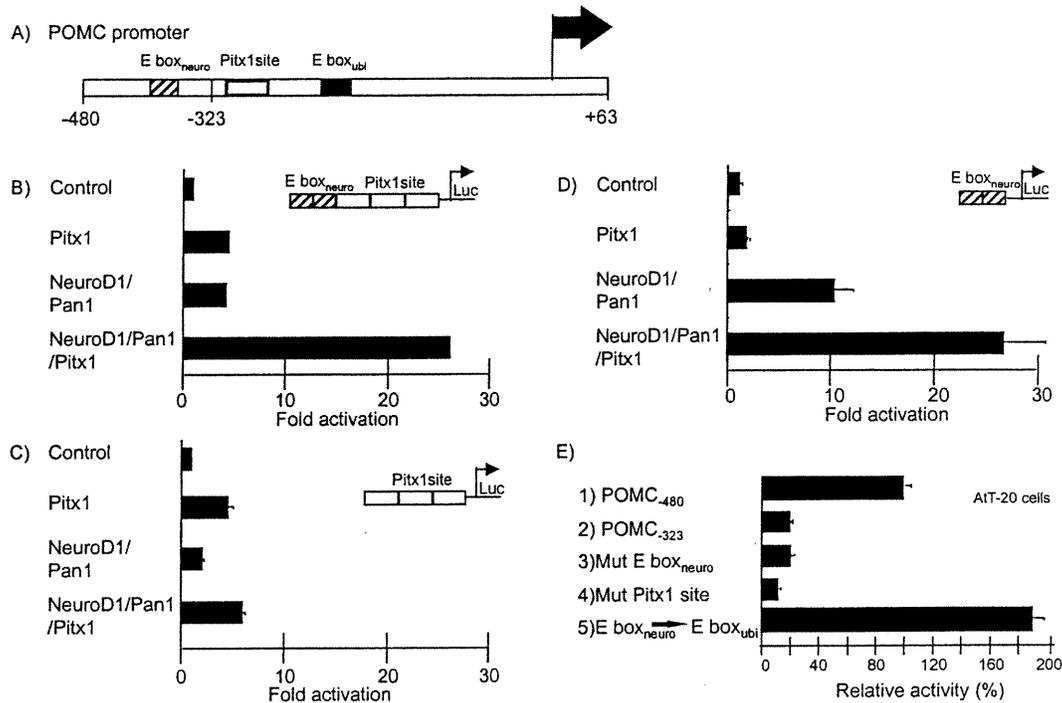


Figure III.1 Binding site requirement for synergism between NeuroD1/Pan1 heterodimers and Pitx1. A) Schematic representation of the rat POMC promoter (-480 to +63 bp) and relative positions of E box_{neuro}, Pitx1 binding site and E box_{ubi}. B) Synergism between bHLH heterodimers (NeuroD1/Pan1) and homeoprotein (Pitx1) reconstituted in co-transfected L cells. A luciferase (Luc) reporter gene was used to assess transcriptional activity. The reporter contained three copies of the POMC gene Pitx1 binding site or two copies of the E box_{neuro} as indicated. C) and D) are the same experiments as in B, but with a Pitx1 site or with the E box_{neuro} containing reporter respectively. E) AtT-20 cells were transfected with a luciferase reporter gene driven by the intact POMC promoter (1), a promoter-deleted of its distal domain (2), a promoter with a mutated E box_{neuro} (3), a promoter with a mutation of the Pitx1 binding site (4) or an E box specificity mutant promoter in which E box_{neuro} is transformed into E box_{ubi} (5). Results are the average (\pm standard error of the mean, s.e.m.) from three sets of duplicate experiments (C, D and E) or one representative experiment (B).

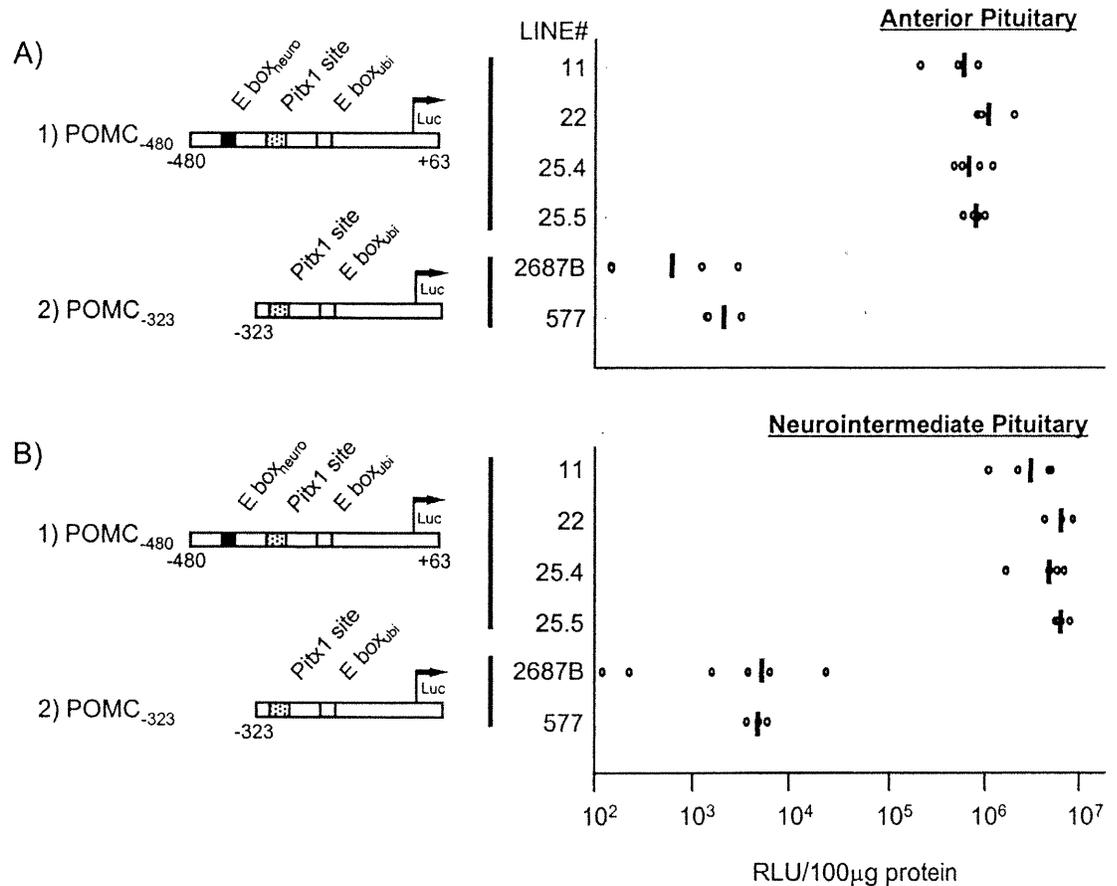


Figure III.2 Pituitary expression of POMC-luciferase transgenes. Two different transgenes driven by either intact POMC promoter (POMC₋₄₈₀) or a deleted promoter (POMC₋₃₂₃) were assessed for luciferase activity in pituitary tissues. POMC₋₃₂₃ transgenic mice lines (2687B or 577) show a 1000-fold reduced activity in both anterior (A) and neurointermediate pituitary (B) compared to POMC₋₄₈₀ lines 11, 22, 25.4 and 25.5. Every open circle represents luciferase activity in an individual mouse and the bar is the calculated average. Results are expressed in relative light units (RLU) and standardized according to the amount of protein.

III.4.2 NeuroD1 expression is restricted to corticotroph cells during pituitary development.

The unique role played by NeuroD1 for sequence-specific recognition of the distal E box_{neuro} (Poulin et al., 1997) suggests that this bHLH factor may be an important developmental regulator of POMC expression. In order to assess this possibility, we followed NeuroD1 expression during pituitary development using a NeuroD1-specific antiserum. Before corticotroph differentiation, at E11 of mouse development, NeuroD1 is not expressed in Rathke's pouch but expression is found in dorsal root ganglia (Fig. III.3A) as previously reported by *in situ* hybridization (Lee et al., 1995).

NeuroD1 expression started at E12 within the region of the nascent anterior lobe (n.a.l.) of the pituitary (Fig. III.3B). At E13, NeuroD1 positive cells were observed within the ventral portion of anterior lobe (Fig. III.3C). From E16 onward, NeuroD1 was no longer detected in the anterior lobe but olfactory neurons still expressed it (Fig. III.3D) as reported (Lee et al., 1995). The onset of this pituitary expression correlated well with *in situ* hybridization (data not shown). However, NeuroD1 transcripts were detected (Poulin et al., 1997) in the adult pituitary, but no proteins could be detected (data not shown). Co-immunohistochemistry experiments performed on E14 pituitaries revealed that all NeuroD1-positive cells (brown) were also ACTH-positive (blue) (Fig. III.3E, F, and data not shown). Thus, NeuroD1 appeared just before POMC around E12 to E12.5, and its pituitary expression is entirely restricted to ACTH-producing cells.

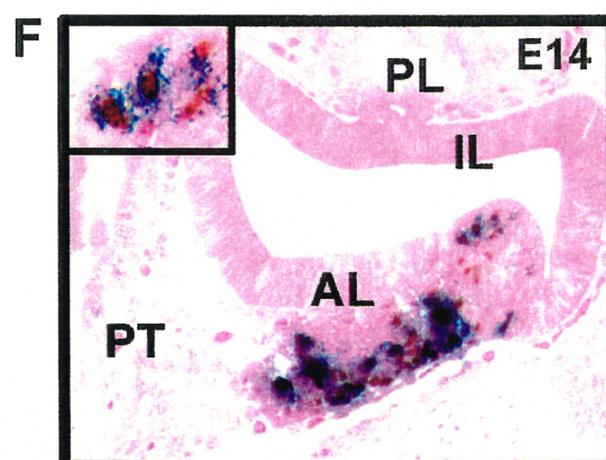
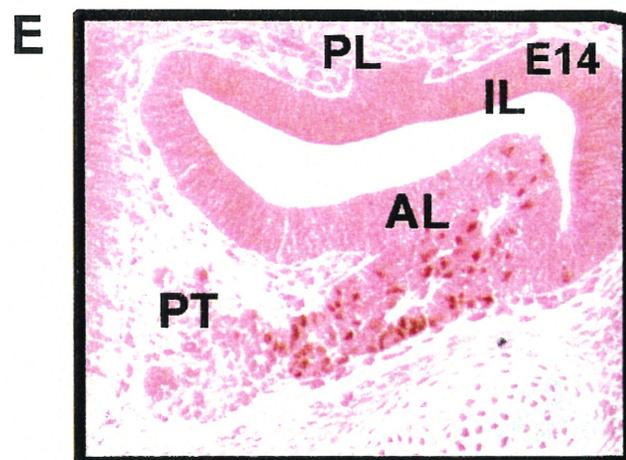
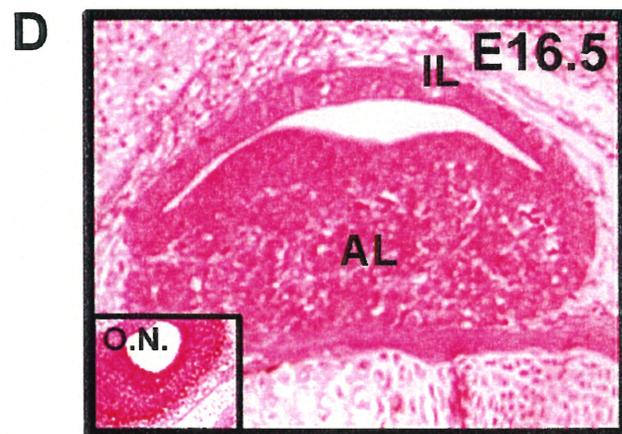


Figure III.3. Correlation of NeuroD1 and POMC expression during pituitary development. A) NeuroD1 immunoreactivity (brown) is not detected by immunohistochemistry in Rathke's pouch (RP) or infundibulum (I) at E11, but it is present in nuclei of dorsal root ganglia cells (DRG, inset). B) NeuroD1 was detected in the nascent anterior lobe (NAL) at E12 (B), in the ventral portion of the anterior lobe (AL) indicated by arrows at pituitary E13 (C), but no expression could be detected at E16.5 in anterior lobe although it was still expressed in olfactory neurons (O.N. inset). E) At E14, expression is seen in anterior lobe, but not in pars tuberalis (PT), intermediate lobe or in posterior lobe (PL). F) Co-immunohistochemistry against-ACTH (blue) and anti-NeuroD1 (brown) was performed on E14. ACTH-positive cells are also positive for NeuroD1. There are a few NeuroD1-positive nuclei in this section that do not appear positive for ACTH: however, the same cells were ACTH-positive on the consecutive section (not shown). Higher magnification (inset) shows co-expression of ACTH and NeuroD1 in individual cells.

III.4.3 Pan1 interacts physically with Pitx1.

The activity of the POMC promoter E box_{neuro}⇒E box_{ubi} mutant (Fig. III.2A) suggested that ubiquitous bHLH factors could mediate the synergistic interaction with Pitx1. To test the possibility of a physical interaction between Pitx1 and Pan1 or NeuroD1, pull-down assays were performed using purified MBP-Pitx1 and *in vitro* produced ³⁵S-methionine labeled NeuroD1 and Pan1 (Fig. III.4A lanes 1 and 4). In presence of purified MBP-LacZ and MBP-Pitx1 (Fig. III.4A lanes 2 and 3), no interaction with NeuroD1 could be detected. However, Pan1 was retained by a MBP-Pitx1 column (about 20%) and not by a MBP-LacZ column (Fig. III.4A lanes 4 to 6). The demonstration of an interaction between Pan1 (but not NeuroD1) and Pitx1, is in accordance with the effect of the E box specificity mutant (Fig. III.2A) and suggests that Pan1 mediates the synergistic interaction with Pitx1.

III.4.4 The bHLH domain of Pan1 is essential for Pitx1 interaction.

We next identified the Pan1 domain responsible for Pitx1 interaction by using two different Pan1 C-terminal truncations in the pull-down assay. The first is a 20 amino acid deletion (mutant 1-618) which migrates slightly faster than the full-length Pan1 (1-638) (Fig. III.4B lanes 4 and 1) and the second mutation is a deletion of the bHLH domain (1 to 414) (Fig. III.4B lane 7). The 1-618 mutant did not interact with MBP-LacZ (Fig. III.4B lane 5) but interacted with MBP-Pitx1 at the same level as full-length Pan1 (Fig. III.4B lanes 6 and 3). However, mutant 1-414 deleted of its bHLH domain, but still containing its leucine rich region did not have the capacity to interact with MBP-Pitx1 (Fig. III.4B lane 9). Thus, the last 204 amino acids that mainly constitute the bHLH domain of Pan1 are required to mediate Pitx1 interaction.

III.4.5 Heterodimers formed between NeuroD1 and Pan1 can interact with Pitx1.

We tested the capacity of NeuroD1/Pan1 heterodimers to interact with Pitx1. As shown above, NeuroD1 is not capable of interaction with Pitx1 (Fig. III.4C lanes 1 to 3). However, when NeuroD1 is co-synthesized with Pan1, the resulting heterodimers are

retained by MBP-Pitx1 (Fig. III.4C lanes 4 to 6). A mutant containing solely the Pan1 bHLH domain (aa 512 to 618) can form heterodimers with NeuroD1 and these heterodimers also interacted with Pitx1 (Fig. III.4C lanes 7 to 9). These data extend the mapping of the bHLH domain by C-terminal deletion (Fig. III.4B) and they indicate that a small bHLH polypeptide of a 97 aa is sufficient for dimer formation with NeuroD1 and for interaction with Pitx1. The same bHLH polypeptide was tested for its ability to form active dimers and to synergize with Pitx1 in transfection experiments (Fig. III.4D). By comparison to the data of Figure 1B using the full-length Pan1, it can be concluded that the short Pan1 bHLH domain is entirely sufficient to form active heterodimers with NeuroD1, and to mediate the synergistic interaction with Pitx1.

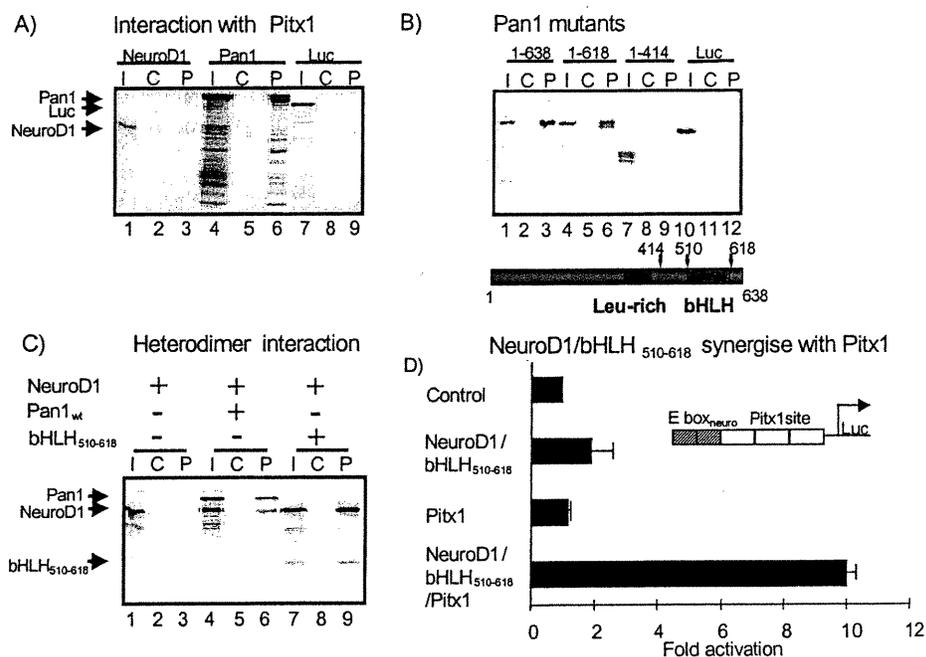


Figure III.4. Direct interaction between Pan1 bHLH domain and Pitx1 homeodomain. A) Pan1 but not NeuroD1 can interact with Pitx1 *in vitro*. A pull-down assay was set up using resin-bound control (C) and MBP-Pitx1 (P) together with ³⁵S-labeled NeuroD1, Pan1 or luciferase synthesized *in vitro*. The arrows point to the main protein products. Input (I) is 20% of the amount used in C and P. B) Deletion of Pan1 bHLH domain impairs Pitx1 interaction. Two C-terminal deletions of Pan1 were produced. One that removes the 20 last amino acids (1-618) and another deleting 224 amino acids (1-414) which removes the bHLH domain. Pull-down is as above except that I is 10%. C) NeuroD1/Pan1 heterodimers interact with Pitx1 through Pan1 bHLH₅₁₀₋₆₁₈. NeuroD1 (N1) and Pan1 (P1) or its bHLH domain (bHLH₅₁₀₋₆₁₈) were co-synthesized *in vitro*. D) bHLH₅₁₀₋₆₁₈ is sufficient to form an active NeuroD1 heterodimer with conserved synergistic capacity with Pitx1 in transfected L cells.

III.4.6 The Pitx1 homeodomain (HD) is sufficient for Pan1 interaction.

In order to define the region of Pitx1 involved in synergism with Pan1, a set of Pitx1 deletion mutants (Tremblay et al., 1999) was tested using the simplest reporter system available: the different Pitx1 mutants were co-transfected in L cells with a reporter containing trimers of the E box_{ubi} upstream of the minimal POMC promoter. This reporter only requires Pan1 homodimers for activation and it is not a target for Pitx1, thus enhancement of transcriptional activity can be ascribed to an *in vivo* interaction between Pan1 homodimers and Pitx1 or its deletion mutants. Pan1 expression activated the E box_{ubi} reporter around 12-fold and Pitx1 on its own did not affect its activity (Fig. III.5A). However, when both were present, activity was stimulated 28-fold (Fig. III.5A, Pan1/Pitx1). In agreement with previous data, this suggests that Pitx1 interacts with Pan1 *in vivo*. Deletion of the N- or C-terminal domains of Pitx1 (Fig. III.5B and C) did not affect its ability to enhance Pan1-dependent activity. However, the N-terminal domain on its own did not show synergism with Pan1 (Fig. III.5D), but the HD did (Fig. III.5E). In order to verify whether the HD is also sufficient for *in vitro* interaction with Pan1, MBP-Pitx1 deletion mutants were produced and used in pull-down assays. Two truncated Pitx1 proteins containing the HD with or without the N-terminus were fused to MBP and tested for Pan1 interaction. Both mutants were capable of *in vitro* interaction with Pan1 (Fig. III.5F, lanes 5 and 7, respectively) but not with MBP-lacZ (lanes 6 and 8). Thus, the HD seems sufficient and essential for Pan1 interaction (Fig. III.5F) and for transcriptional synergism with Pan1 (Fig. III.5E). A similar transcriptional synergism was observed with another ubiquitous bHLH, ITF2 (data not shown).

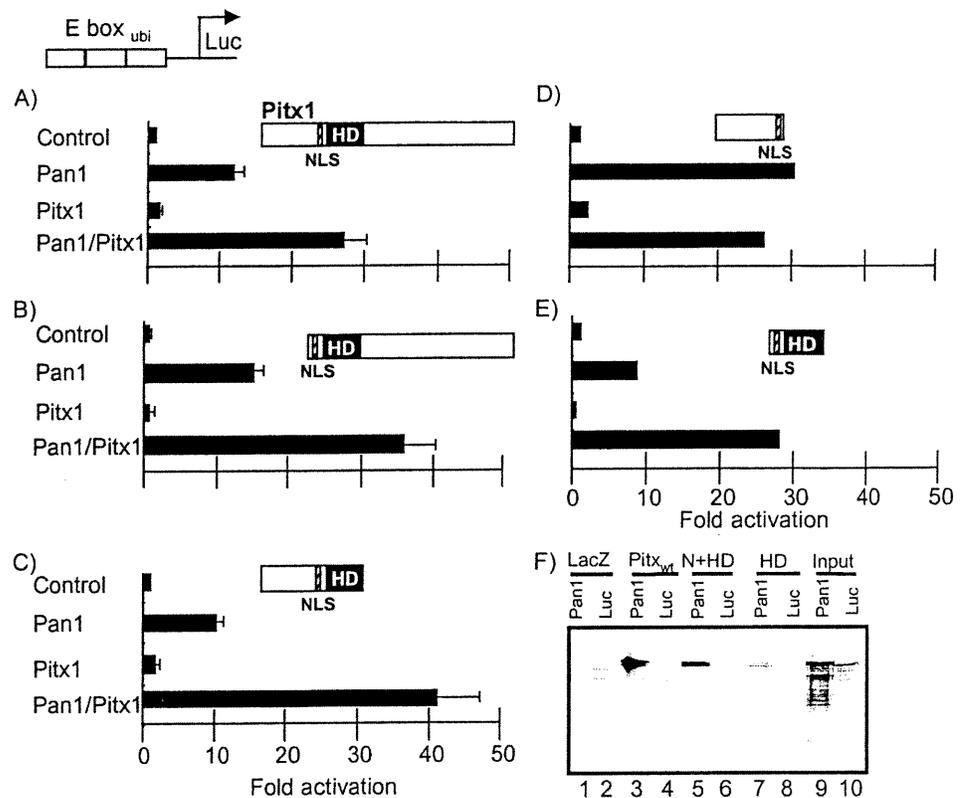


Figure III.5 Pitx1 homeodomain can interact *in vivo* with Pan1. Transient transfections were performed in L cells using a luciferase reporter containing three copies of E box_{ubi}. Transfections were done with mammalian expression vectors for the indicated cDNAs. Various deletion mutants of Pitx1 (A) were used, including a N-terminal deletion (B), a C-terminal deletion (C), the N-terminus (D) and the homeodomain (HD) (E). These mutants were previously shown to be expressed at similar levels (Tremblay et al., 1999). The results are the average (\pm s.e.m.) of at least two independent experiments performed in duplicate. F) The Pitx1 HD is sufficient for interaction with Pan1. The following MBP fusion proteins were used for interaction with Pan 1 : LacZ as control, Pitx_{wt} is MBP-Pitx1, N+HD or HD are the N-terminal region and/or the of Pitx1 HD fused to MBP.

III.4.7 Pan1 interaction is restricted to the Pitx subfamily.

We tested whether other members of the bicoid-related family of HD could interact with Pan1. When compared to Pitx1, Pitx2 and 3 have highly homologous HD but Gsc and Otx1 are more distantly related. As for Pitx1, Pan1-dependent activity was enhanced by Pitx2 or Pitx3 (Fig. III.6A and B). In contrast, Gsc and Otx1 were without effect when co-transfected with Pan1 (Fig. III.6C and D). To correlate this specificity with *in vitro* interaction, pull-down assays were used to show that the small Pan1 bHLH domain (Fig. III.4C) does not interact with MBP-Gsc or MBP-Nkx2.5 (another HD protein) (Fig. III.6E) in accordance with *in vivo* experiments (Fig. III.6C and data not shown). Thus, Pan1 can only interact with the members of the Pitx subfamily. To confirm that Pitx1 and Pan1 can interact *in vivo*, nuclear extracts from COS cells over-expressing Pitx1 and Pan1 (Fig. III.6F) or from normal AtT-20 cells (Fig. III.6G) were subjected to co-immunoprecipitation. Western blot analysis of the immunoprecipitates revealed Pan1 (Fig. III.6F, lane 1 and Fig. III.6G, lane 2) in extracts immunoprecipitated with a Pitx1 antiserum (α Pitx1) but not in control IgG-treated extracts (Fig. III.6F, lane 3 and 6G, lane 1). Thus, Pan1 and Pitx1 interact as efficiently *in vivo* as *in vitro*.

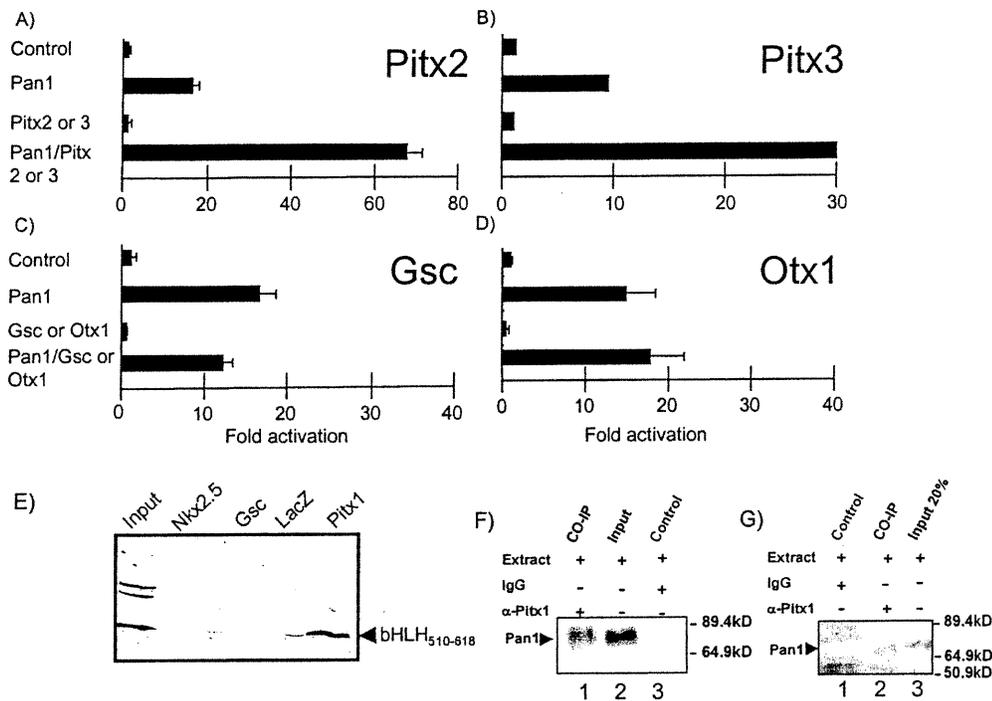


Figure III.6. Pan1 interaction is specific to Pitx family. In experiments performed as in Figure 3.5, Pitx2 (A) and Pitx3 (B) show the same synergism as Pitx1 (Fig. III.5A) but not goosecoid (Gsc, C) or Otx1 (D). Results are the average (\pm s.e.m.) of at least two experiments performed in duplicate. E) Gsc and Nkx2.5 homeoproteins do not interact with Pan1 *in vitro*. Pull-down assays were performed with the small *in vitro* synthesized bHLH domain of Pan1 and purified MBP-Nkx2.5, MBP-Gsc, MBP-LacZ and MBP-Pitx1. Input was 10% of the amount used. F) An anti-Pitx1 antibody co-immunoprecipitates Pan1. Nuclear extracts were prepared from COS-1 cells transfected with Pitx1 and Pan1 expressing plasmids and 10 μ g of extracts were used for each of co-immunoprecipitation (CO-IP), input and control samples. G) Co-immunoprecipitation of Pan1 with Pitx1 from nuclear extracts of untreated AtT-20 cells. Experiment performed as in F, except that 200 μ g of extracts were used for each sample.

III.5. Discussion

We have demonstrated lineage-restricted expression of NeuroD1 in the pituitary; indeed, NeuroD1 is expressed only in corticotroph cells and its expression begins just prior to POMC (Fig. III.3). Thus, NeuroD1 is the only corticotroph-restricted factor known so far. This neurogenic bHLH has otherwise been implicated in neuronal differentiation and pancreas development (Naya et al., 1995; Lee et al., 1995; Naya et al., 1997; Miyata et al., 1999). We have presented evidence supporting a direct protein:protein interaction mechanism by which NeuroD1 heterodimers can take part in cell-specific transcription of pituitary POMC. This interaction between bHLH and HD transcription factors is generally relevant since the direct interaction between these proteins involves the ubiquitous class A dimerization partner of NeuroD1. The role of NeuroD1 in this system is to ensure specificity of E box recognition.

III.5.1 NeuroD1 and POMC transcription.

We have shown lineage-restricted pituitary expression of NeuroD1 in corticotroph cells with an onset at E12 that is consistent with the onset of POMC expression (Fig. III.3). The transient presence of NeuroD1 protein in corticotroph cells between E12 and E16 of mouse development would be consistent with the involvement of other neurogenic bHLH in corticotroph cells before or after NeuroD1. Indeed, this might be analogous to the sequential involvement of the neurogenins 1 and 2, and of NeuroD1, during neuronal differentiation (Ma et al., 1999). NeuroD1 is only one of the many neurogenic bHLH related to drosophila atonal that are implicated in neuronal differentiation (Lee, 1997). Other factors of the NeuroD or neurogenin subfamily may also form heterodimers with class A ubiquitous bHLH, and exhibit DNA binding specificity similar to that of NeuroD1 heterodimers. Thus, different neurogenic bHLH could act sequentially as heterodimers on the E box_{neuro} of the POMC promoter. In such model, the AtT-20 cells would be representative of the E12 to E16 developmental window during

corticotroph differentiation since all their E box_{neuro} binding activity contains NeuroD1 (Poulin et al., 1997).

NeuroD1 heterodimers are essential for efficient transcription of the POMC gene in AtT-20 cells (Poulin et al., 1997). Mutagenesis of their target site, the E box_{neuro}, has the same deleterious effect as deletion of the entire distal region of the promoter or mutagenesis of the Pitx1 binding site (Fig. III.1E) or for that matter, deletion of the central region of the promoter that contains the Pitx1 binding site (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993). Hence, the E box_{neuro} is an essential element of the POMC enhancer. The highly specific binding and activation of this target by NeuroD1 heterodimers (Poulin et al., 1997) indicates that the role of NeuroD1 in promoter activation is to ensure selective recognition of E box_{neuro}. *In vivo*, transgenic promoter studies (Fig. III.2) reveal that the role of the enhancer region containing E box_{neuro} is quantitatively much more important than suggested from transfection studies (Fig. III.1E). However, NeuroD1 itself may not be required *sensu strictu* for transcription. Indeed, replacement of E box_{neuro} by an E box_{ubi} sequence restored promoter activity indicating that the requirement is for bHLH dimers rather than for NeuroD1 itself (Fig. III.1E). This is consistent with the mechanism for interaction between bHLH and Pitx described in the present work, but it also suggests that other bHLH of DNA binding specificity similar to that of NeuroD1 may substitute for NeuroD1, for example later in development after NeuroD1 protein is no longer detected.

Within the native POMC promoter, the E box_{neuro} is separated from the Pitx binding site by 67 bp (Therrien and Drouin, 1993). This spacing suggests that the interaction between DNA-bound bHLH dimers and Pitx proteins is not like that of factors bound to neighboring DNA sites, which may interact with each other through side surfaces, like for example the Hox and Pbx homeoproteins (Chan et al., 1994; Lu and Kamps, 1996; Chang et al., 1995; Phelan et al., 1995). The interaction between bHLH factors and Pdx1 identified in the insulin promoter is another example of proteins bound to adjacent DNA sites (Ohneda et al., 2000). This interaction results in weakly cooperative DNA binding as illustrated

in Figure 7A. In contrast, the distance between E box_{neuro} and the Pitx binding site on the POMC promoter suggests that interaction between these proteins occurs through surfaces that are opposite to the DNA-interacting surface, as suggested by the model of Figure 7A. In this model, the bending of promoter DNA required to bring Pitx and bHLH proteins together results in very different contact surfaces between the proteins, as compared to their respective orientation when bound to adjacent sites on DNA. Differences of bHLH/HD interaction on the POMC and insulin promoters are further highlighted by the unique specificity of each interaction as discussed below.

We have documented the Pan1/Pitx1 physical interaction in different ways: the *in vitro* pull-down assay was useful to map interaction domains and this analysis correlated well with transcriptional synergism (Fig. III.4). In addition, we could show transcriptional synergism even in absence of DNA-binding by Pitx1 (Fig. III.1D and 5) but not the reverse, i.e. in absence of DNA-binding by bHLH dimers (Fig. III.1C). Most importantly, we showed by co-immunoprecipitation that Pitx1 and Pan1 are present in a common complex *in vivo* whether these proteins are over-expressed in heterologous cells (Fig. III.6F) or not, as in POMC-expressing AtT-20 cells (Fig. III.6G). We have previously shown transcriptional dependence of the POMC enhancer on multiple regulatory elements, including the E box_{neuro} and Pitx binding site (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993) (Fig. III.1E). The cognate transcription factors appear to be present together in a multi-protein complex (Fig. III.6G) that may associate with the POMC promoter (Fig. III.7A); this protein complex may also contain other POMC transcription factors.

III.5.2 Specificity of bHLH / HD interactions.

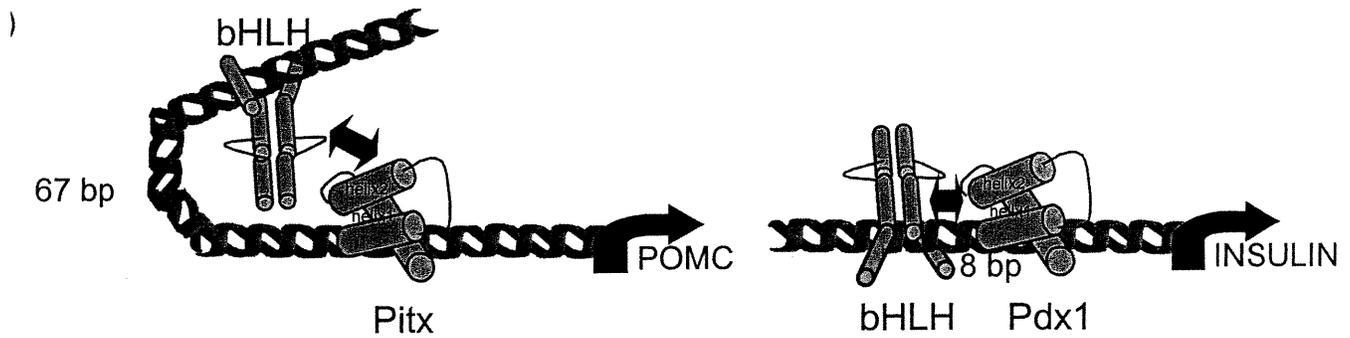
The interaction between bHLH and HD factors appears quite specific with regard to the HD. The HD of Pitx1, Pitx2 and Pitx3 are nearly identical to each other and it is not surprising that all three should interact with Pan1. However, their closest relatives, the Otx and Gsc HD, do not share this property (Fig. III.6 and 3.7C) despite the fact that they bind the same target DNA sequence (Drouin et al., 1998a; Drouin et al., 1998b). The HD of another subfamily, Nkx2.5, was

also found incapable of interaction with Pan1. Although no other HD shares significant homology with the Pitx HD, it cannot be excluded that other members of the HD family might interact with Pan1. Indeed, the pancreas-specific HD protein Pdx1 exerts transcriptional synergism with Pan1 on the rat insulin promoter (Peers et al., 1994) and these proteins interact directly *in vitro* (Ohneda et al., 2000). However, the bHLH/HD interaction between Pan1 and Pdx1 appears different by comparison to that of Pan1 with Pitx1. Indeed, whereas Pdx1 can interact just as well *in vitro* with the class A bHLH Pan1 (E47) as with class B bHLHs like NeuroD1, MyoD, Mash1, but not Tal1 (Ohneda et al., 2000), Pitx1 only interacts with the class A bHLH and not with NeuroD1 (Fig. III.4A, C). Further, this specificity highlights another more important difference: since NeuroD1 does not form homodimers (Naya et al., 1995), its *in vitro* binding with Pdx1 suggests that the Pdx1/bHLH interaction only requires a bHLH monomer. In striking contrast, NeuroD1 on its own does not interact with Pitx1 (Fig. III.4A, C) but will form part of a Pitx1 complex when heterodimerized with Pan1 or its bHLH domain (Fig. III.4C): these observations suggest that, in contrast to Pdx1, Pitx homeoproteins may only interact with bHLH dimers, although definite proof of this would require experiments with dimerization-deficient mutants of a bHLH, like Pan1, that interact with both Pdx1 and Pitx1.

The bHLH domains involved in interaction with Pitx and/or Pdx proteins have been aligned to reveal similarities and differences (Fig. III.7B). This comparison shows few amino acid residues (shaded in light gray) that are conserved between class A (Pan1,2/E47,E12 and ITF2/E2-2) and class B bHLH (NeuroD1, MyoD): a subset of these are involved in maintaining the integrity of the bHLH tertiary structure (Ellenberger et al., 1994) and others could be involved in the interaction with Pdx1. Class A bHLH residues that are unique to this class and that may interact with Pitx proteins were subdivided in two subgroups: those that are involved in tertiary structure or dimer formation (boxed in dark gray) and that are less likely to be available for Pitx interaction, and those that face the outside surface of the bHLH domain (boxed in black) and that constitute the best candidates for Pitx interaction. These later residues are

mostly found in helix 1 and after helix 2 (Fig. III.7B). When a similar analysis was performed on related HDs that do or do not interact with class A bHLH, a subset of residues primarily found in helix 1 and 2 of the Pitx HD were identified (Fig. III.7C). Only four of those are conserved in Pdx1, again highlighting the differences between the Pitx and Pdx HDs. Thus, in considering amino acid homologies in these domains both from the perspective of the bHLH domain as well as the HD domain, the specificity of their interaction is much more stringent for Pitx and class A bHLH than for Pdx and both class A and B bHLH.

bHLH factors were previously shown to interact with other transcription factors, some of which have HD domains. However, none of these interactions were found to involve the HD itself. Indeed, bHLH factors interact with HD factors *Imx1.1* and *Imx1.2* (*Imx1a/Imx1b*) and with LIM-only proteins like *LMO2* (Larson et al., 1996; Wadman et al., 1997; Johnson et al., 1997). In both cases, the interaction is between the LIM domain, a zinc finger-like structure, and the bHLH domain. Recently, an *in vitro* interaction between myogenic bHLH heterodimers and HD proteins of the *Pbx/Meis* family was reported (Knoepfler et al., 1999). However, this interaction is very different by comparison to the bHLH/Pitx interaction reported here. The *Pbx/Meis* factors interact with an amino acid motif that is present in N-terminal of the myogenic factor bHLH domain: this motif is similar to the tryptophan-containing motif recognized by *Pbx/Meis* in Hox HD proteins (Chan et al., 1994; Chang et al., 1996; Lu and Kamps, 1996; Phelan et al., 1995). In summary, the interaction between bHLH and Pitx HD proteins is unique in that 1) it is specific to class A bHLH, 2) the bHLH must be in a homo- or heterodimer that interacts through the class A bHLH, and 3) it is restricted to the Pitx subfamily.



	basi		jc	helix		loo	helix		Interaction with	
	Pit	Pd	Pit	Pd	Pit	Pd	Pit	Pd	Pit	Pd
n1 (E47):	DRHRRMANNAREVR	VRD	INEAFRELCRMCO	LHLKSDKAQT	KL LIECQAVVHILGLEQQ	VRERNL	++	++	++	++
n2 (E12):	EKERRVANNARERLR	VRD	INEAFKEICRMCO	LHLSTKPKQT	KL LILHQA VAVILSLEQQ	VRERNL	++	++	++	++
F2 (E2-2):	EKERRMANNARERLR	VRD	INEAFKEICRMCO	LHLKSEKPKQT	KL LILHQA VAVILSLEQQ	VRERNL	++	++	++	++
uroD1:	FKLRMKNANARENR	MHG	INAALDNERKVVVP	CYSKTOK·LS	KIETERLAKNYIWAISEI	LRSGKL	--	--	monomer	++
oD:	NADRRKAATMRERRR	LSK	VNEAFETLKRCTS	S·NPNQR·LP	KVEILRNAI RYIEGLQAL	LRDQDA	--	--	monomer	++

	helix1	turn1	helix2	turn2	helix3	
tx1:	QRRQRTHFT	SOOLQELEATFOR	NRYPD	MSMREELAVW	TNLT	EPRVRVWFKNRRAKWRKRE
tx2:	QRRQRTHFT	SOOLQELEATFOR	NRYPD	MSTREELAVW	TNLT	EARVRVWFKNRRAKWRKRE
tx3:	QRRQRTHFT	SOOLQELEATFOR	NRYPD	MSTREELAVW	TNLT	EARVRVWFKNRRAKWRKRE
x1:	QRRERTTFT	RSOLDVLEALEAK	TRYPD	IFMREEVAIK	INLP	ESRVQVWFKNRRAKCROQQ
c:	KRRHRTIET	DEOLEALENLEQE	TKYPD	VGTREQLARK	VHLR	E EKVEVWFKNRRAKWRRQR
κ:	NKRTRTAYT	RAQLLELEKEFLF	NKYIS	RPRRVEELAVM	LNLT	ERHIKIWFQNRMMKWKKEE

Figure III.7. Specificity of interactions between Pitx homeodomain and bHLH dimers. **A)** Schematic drawing representing the Pitx homeodomain and bHLH dimers bound to their respective sites which are separated by 67 bp in the POMC promoter. In view of the distance between these sites, it is likely that promoter DNA is bent in order to allow interaction between these proteins. In contrast, bHLH factors also interact with the homeodomain of another factor, Pdx1, on the insulin promoter. In this case, the binding sites for these two factors are almost adjacent (separated by 8 bp). **B)** Alignment of the bHLH domains of class A bHLH that interact with Pitx and/or Pdx1 and of NeuroD1 and MyoD1 which were shown to interact with Pdx1 but not with Pitx1 (NeuroD1). The protein interaction data are summarized on the left of the sequence alignment; the Pitx data are from this paper and the Pdx data are from Ohneda et al (Ohneda et al., 2000). Pdx1 is inferred to interact *in vitro* with monomers of NeuroD1 and MyoD since these class B bHLH are not thought to form homodimers (Naya et al., 1995; Hollenberg et al., 1995). Pitx1 does not interact *in vitro* with NeuroD1 but will interact with heterodimers that contain NeuroD1 and the Pan1 bHLH domain (Fig. 3.4C). In the sequence alignment, amino acid residues that are conserved in all five bHLH domains are shown in light gray shading. Residues that are specific to the class B bHLH are shown in dark gray shading for residues that are involved in maintenance of bHLH tertiary structure or dimerization, and in a back boxes for those conserved residues that are facing towards the outside of bHLH domain, and that constitute the best candidates for Pitx interaction. This analysis was based on modeling the various bHLH sequences using the X-ray structure of the E47 bHLH (Ellenberger et al., 1994). **C)** Homology between the HD of the bicoid-related HD proteins and Pdx1. Shading is used as in B above to indicate conserved residues between all homeodomains (light gray shading), conserved Pitx residues that are involved in maintenance of tertiary structure (dark gray shading) and residues that are specific to the Pitx HD and that are accessible on the surface of the HD for protein:protein interaction (black box shading). This analysis was based on the X-ray structure of the *Antennapedia* HD-DNA complex (Fraenkel and Pabo, 1998).

III.5.3 A developmental code involving homeodomain and bHLH factors.

HD genes have been involved in patterning, specification of segmental identity and sometimes, cellular differentiation. Numerous roles have been assigned to Pitx factors including hindlimb specification (Pitx1), left-right asymmetry (Pitx2), neuronal differentiation (Pitx3), eye development (Pitx2 and Pitx3), and craniofacial development (Pitx1 and Pitx2). Even though tissue-restricted bHLH factors have not been implicated in all these systems, ubiquitous bHLH factors like Pan1 are expressed in all these structures, and therefore a Pan1/Pitx interaction would be possible in many of these tissues. However, co-expression of these genes is not a sufficient criterion for significant physical interaction. Indeed, promoter context is likely to play a critical role for cross-talk between these transcription factors. We have preliminary data to support the hypothesis of bHLH/Pitx interaction involving myogenic bHLH. These observations suggest that interactions between Pitx and bHLH factors might be of general relevance. In muscle, both Pitx1 and Pitx2 can be expressed as shown for Pitx1 in muscles of the posterior half of the body (Lanctôt et al., 1997) and for Pitx2 in myotomes, myoblast, and muscles (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998). Hence, interactions between Pitx factors that may be involved in muscle patterning (Logan et al., 1998; Logan and Tabin, 1999) and myogenic bHLH that are essential for muscle differentiation (Molkentin and Olson, 1996) may represent one mechanism by which molecular cross-talk is achieved between these two families of developmental regulators. Similarly, neuronal development might involve interactions between Pitx and bHLH factors at the level of common target genes.

III.6. Acknowledgment

We are grateful to Drs Ming Tsai, François Guillemot, and Harold Weintraub for providing the BETA2/NeuroD1 and MyoD plasmids, respectively. Daniel Durocher was helpful in pull-down experiments. The efficient secretarial assistance of Lise Laroche was much appreciated. G.P. is a recipient of a Terry Fox Studentship of the National Cancer Institute of Canada. This work was funded by The National Cancer Institute of Canada supported with funds provided by the Canadian Cancer Society.

III.7. References

- Apelqvist,A., Sommer,L., Beatus,P., Anderson,D.J., Honjo,T., Hrabe de Angelis,M., Lendahl,U., and Edlund,H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-881.
- Aplan,P.D., Nakahara,K., Orkin,S.H., and Kirsch,I.R. (1992). The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J.* 11, 4073-4081.
- Blackwell,T.K. and Weintraub,H. (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104-1110.
- Campione,M., Steinbeisser,H., Schweickert,A., Deissler,K., van Bebber,F., Lowe,L.A., Nowotschin,S., Viebahn,C., Haffter,P., Kuehn,M.R., and Blum,M. (1999). The homeobox gene Ptx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 126, 1225-1234.
- Chan,S.K., Jaffe,L., Capovilla,M., Botas,J., and Mann,R.S. (1994). The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell* 78, 603-615.
- Chang,C.P., Brocchieri,L., Shen,W.F., Largman,C., and Cleary,M.L. (1996). Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1734-1745.
- Chang,C.P., Shen,W.F., Rozenfeld,S., Lawrence,H.J., Largman,C., and Cleary,M.L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* 9, 663-674.
- Drouin,J., Lamolet,B., Lamonerie,T., Lanctôt,C., and Tremblay,J.J. (1998a). The Ptx family of homeodomain transcription factors during pituitary development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140, 31-36.

Drouin, J., Lanctôt, C., and Tremblay, J.J. (1998b). La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *médecine/sciences* 14, 335-339.

Duboule, D. (1994). *Guidebook to the homeobox genes.*, D. Duboule, ed. (Oxford, U.K.: Sambrook & Tooze Publication), pp. 1-284.

Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J., and Nemer, M. (1997). The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16, 5687-5696.

Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., and Harrison, S.C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* 8, 970-980.

Gage, P.J. and Camper, S.A. (1997). Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum. Mol. Genet.* 6, 457-464.

Gage, P.J., Suh, H., and Camper, S.A. (1999). The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm. Genome* 10, 197-200.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1607-1611.

Graham, A. and McGonnell, I. (1999). Limb development: Farewell to arms. *Curr. Biol.* 9, R368-R370.

Guillemot, F. and Joyner, A.L. (1993). Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech. Dev.* 42, 171-185.

Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., and Joyner, A.L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.

Hanes, S.D. and Brent, R. (1989). DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *Cell* 57, 1275-1283.

Harvey, R.P. (1998). Links in the left/right axial pathway. *Cell* 94, 273-276.

Hollenberg, S.M., Sternglanz, R., Cheng, P.F., and Weintraub, H. (1995). Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3813-3822.

Johnson, J.D., Zhang, W., Rudnick, A., Rutter, W.J., and German, M.S. (1997). Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3488-3496.

Knoepfler, P.S., Bergstrom, D.A., Uetsuki, T., Dac-Korytko, I., Sun, Y.H., Wright, W.E., Tapscott, S.J., and Kamps, M.P. (1999). A conserved motif N-terminal to the DNA-binding domains of myogenic bHLH transcription factors mediates cooperative DNA binding with pbx-Meis1/Prep1. *Nucleic Acids Res.* 27, 3752-3761.

Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.

Lamonerie, T., Tremblay, J.J., Lanctôt, C., Therrien, M., Gauthier, Y., and Drouin, J. (1996). PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* 10, 1284-1295.

Lanctôt, C., Lamolet, B., and Drouin, J. (1997). The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124, 2807-2817.

Lanctôt,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L., and Drouin,J. (1999). Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* 126, 1805-1810.

Larson,R.C., Lavenir,I., Larson,T.A., Baer,R., Warren,A.J., Wadman,I., Nottage,K., and Rabbitts,T.H. (1996). Protein dimerization between LMO2 (RBTN2) and TAL1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1021-1027.

Lassar,A.B., Davis,R.L., Wright,W.E., Kadesch,T., Murre,C., Voronova,A., Baltimore,D., and Weintraub,H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315.

Lee,J.E. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr. Neurobiol.* 7, 13-20.

Lee,J.E., Hollenberg,S.M., Snider,L., Turner,D.L., Lipnick,N., and Weintraub,H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.

Logan,M., Pagán-Westphal,S.M., Smith,D.M., Paganessi,L., and Tabin,C.J. (1998). The transcription factor *Pitx2* mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94, 307-317.

Logan,M. and Tabin,C.J. (1999). Role of *Pitx1* upstream of *Tbx4* in specification of hindlimb identity. *Science* 283, 1736-1739.

Lu,Q. and Kamps,M.P. (1996). Structural determinants within *Pbx1* that mediate cooperative DNA binding with pentapeptide-containing Hox proteins: proposal for a model of a *Pbx1*-Hox-DNA complex. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1632-1640.

Ma,P.C., Rould,M.A., Weintraub,H., and Pabo,C.O. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-459.

Ma,Q., Fode,C., Guillemot,F., and Anderson,D. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev.* 13, 1717-1728.

Ma,Q.F., Kintner,C., and Anderson,D.J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.

Miyata,T., Maeda,T., and Lee,J.E. (1999). NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.* 13, 1647-1652.

Molkentin,J.D. and Olson,E.N. (1996). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9366-9373.

Mucchielli,M.L., Martinez,S., Pattyn,A., Goridis,C., and Brunet,J.F. (1996). *Otx2*, an *Otx*-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 258-271.

Murre,C., McCaw,P.S., and Baltimore,D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.

Mutoh,H., Fung,B.P., Naya,F.J., Tsai,M.J., Nishitani,J., and Leiter,A.B. (1997). The basic helix-loop-helix transcription factor beta2/neurod is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3560-3564.

Naya,F.J., Huang,H.P., Qiu,Y., Mutoh,H., DeMayo,F.J., Leiter,A.B., and Tsai,M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal

enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* **11**, 2323-2334.

Naya, F.J., Stellrecht, C.M.M., and Tsai, M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* **9**, 1009-1019.

Ohneda, K., Mirmira, R.G., Wang, J.H., Johnson, J.D., and German, M.S. (2000). The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 900-911.

Olson, E.N. and Klein, W.H. (1994). bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* **8**, 1-8.

Peers, B., Leonard, J., Sharma, S., Teitelman, G., and Montminy, M.R. (1994). Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1798-1806.

Peshavaria, M., Henderson, E., Sharma, A., Wright, C.V., and Stein, R. (1997). Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3987-3996.

Phelan, M.L., Rambaldi, I., and Featherstone, M.S. (1995). Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3989-3997.

Piedra, M.E., Icardo, J.M., Albajar, M., Rodriguez-Rey, J.C., and Ros, M.A. (1998). Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* **94**, 319-324.

Poulin,G., Turgeon,B., and Drouin,J. (1997). NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6673-6682.

Raphael,S.J., Apel,R.L., and Asa,S.L. (1995). Brief report: detection of high-molecular-weight cytokeratins in neoplastic and non-neoplastic thyroid tumors using microwave antigen retrieval. *Modern Pathology* 8, 870-872.

Rawls,A. and Olson,E.N. (1997). MyoD meets its maker. *Cell* 89, 5-8.

Ryan,A.K., Blumberg,B., Rodriguez-Esteban,C., Yonei-Tamura,S., Tamura,I., Tsukui,T., de la Peña,J., Sabbagh,W., Greenwald,J., Choe,S., Norris,D.P., Robertson,E.J., Evans,R.M., Rosenfeld,M.G., and Izpisúa Belmonte,J.C. (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394, 545-551.

Semina,E.V., Reiter,R., Leysens,N.J., Alward,W.L., Small,K.W., Datson,N.A., Siegel-Bartelt,J., Bierke-Nelson,D., Bitoun,P., Zabel,B.U., Carey,J.C., and Murray,J.C. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat. Genet.* 14, 392-399.

Shivdasani,R.A., Mayer,E.L., and Orkin,S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.

Sun,X.-H. and Baltimore,D. (1991). An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64, 459-470.

Szeto,D.P., Rodriguez-Esteban,C., Ryan,A.K., O'Connell,S., Liu,R., Kioussi,C., Gleiberman,A.S., Izpisua-Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). Role of the bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* 13, 484-494.

Szeto,D.P., Ryan,A.K., O'Connell,S.M., and Rosenfeld,M.G. (1996). P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7706-7710.

Therrien,M. and Drouin,J. (1991). Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3492-3503.

Therrien,M. and Drouin,J. (1993). Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2342-2353.

Treisman,J., Gonczy,P., Vashishtha,M., Harris,E., and Desplan,C. (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* 59, 553-562.

Tremblay,J.J., Lanctôt,C., and Drouin,J. (1998). The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol. Endocrinol.* 12, 428-441.

Tremblay,J.J., Marcil,A., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1999). Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J.* 18, 3431-3441.

Wadman,I.A., Osada,H., Grutz,G.G., Agulnick,A.D., Westphal,H., Forster,A., and Rabbits,T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.

Weatherbee,S.D. and Carroll,S.B. (1999). Selector genes and limb identity in arthropods and vertebrates. *Cell* 97, 283-286.

Yoshioka,H., Meno,C., Koshiba,K., Sugihara,M., Itoh,H., Ishimaru,Y., Inoue,T., Ohuchi,H., Semina,E.V., Murray,J.C., Hamada,H., and Noji,S. (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94, 299-305.

Zhuang,Y., Soriano,P., and Weintraub,H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-884.

Chapitre IV

Discussion

IV.1. NeuroD1 et la différenciation corticotropique

IV.1.1 Ablation génique de NeuroD1

En identifiant les facteurs de transcription critiques à l'expression histo-spécifique de la POMC, on espérait trouver un ou des facteurs impliqués dans le processus de la différenciation des cellules corticotropes (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993). Un des facteurs critiques qui a été identifié par cette démarche basée sur l'étude des mécanismes histo-spécifiques de la transcription du gène de la *POMC* est NeuroD1. L'analyse de l'expression hypophysaire de *NeuroD1* au cours du développement a montré qu'il débute à e12, quelques heures avant l'expression du gène de la *POMC*. Cette analyse a aussi démontré que l'expression de *NeuroD1* est spécifique aux cellules corticotropes de l'hypophyse. Ainsi, NeuroD1 est le seul facteur de transcription exprimé dans les cellules corticotropes, mais absent des cellules mélanotropes qui produisent aussi la POMC (Poulin et al., 2000a). Ce patron d'expression associé à son activité transcriptionnelle synergique avec Pitx1 suggère un rôle important dans l'initiation de la transcription du gène de la *POMC* et peut-être aussi dans le processus de différenciation des cellules corticotropes. Pour mieux comprendre le rôle de *NeuroD1* dans l'hypophyse, j'ai analysé l'effet de son ablation génique sur l'expression de la POMC (Naya et al., 1997). L'analyse de l'expression de la *POMC* dans les souris NeuroD1 *-/-* montre que son profil d'expression est modifié. En effet, l'expression de la *POMC* au cours du développement semble retardée d'environ une journée par rapport aux embryons normaux (annexe I). Ce léger phénotype est à la fois décevant et excitant. Décevant, parce que *NeuroD1* qui est au centre de la synergie corticotropique nous apparaissait critique pour l'expression du gène de la *POMC*. Ce qui est en quelque sorte faux puisque les embryons n'exprimant pas *NeuroD1* expriment normalement le gène de la *POMC* au stade développemental e16.5 (annexe I). Par contre, il s'agit aussi d'un phénotype intéressant, puisque l'inactivation génique de *NeuroD1* est la seule à ce jour qui perturbe l'expression de la *POMC* sans affecter de façon perceptible la morphogénèse hypophysaire. Le problème

majeur que l'on rencontre dans l'étude des facteurs bHLHs est la redondance fonctionnelle. Le cas classique étant l'inactivation génique de *MyoD* où le phénotype discret ne reflète pas l'importance capitale de *MyoD* dans la myogénèse. Il est donc possible que le rôle joué par *NeuroD1* lors de la différenciation des corticotropes soit masqué par la présence de facteurs de la même famille possédant certaines fonctions biochimiques similaires à celle de *NeuroD1*.

IV.1.2 Rôle de la boîte E_{neuro} dans la spécificité transcriptionnelle du gène POMC

Les expériences de transgénèse qui ont analysé les séquences d'ADN du promoteur POMC qui permettent une expression spécifique à l'hypophyse ont montré que la partie distale contenant la boîte E_{neuro} et l'élément NurRE est très importante. En effet, une baisse de près de mille fois de l'activité luciférase est observée lorsque la partie distale du promoteur POMC est enlevée. (Poulin et al., 2000a). Le résultat de cette expérience peut être interprété de trois façons. La première possibilité est que l'absence de l'élément NurRE qui est contenu dans la partie amputée est la cause de cette perte d'activité. Nous savons que cet élément renforce l'activité synergique de la boîte E_{neuro} et de l'élément Pitx1, mais qu'il n'est pas essentiel à son fonctionnement. Puisque cet élément semble jouer un rôle dans l'activité basale (Therrien and Drouin, 93), on prédirait une diminution de l'expression du gène rapporteur, mais non une quasi-disparition de l'activité luciférase. La seconde possibilité est que la boîte E_{neuro} qui fait aussi partie de l'élément délété explique en bonne partie cet effet drastique. Ainsi, en accord avec l'hypothèse d'un code combinatoire synergique entre facteurs bHLHs et Pitx1 dans les cellules corticotropes, l'absence de cet élément du promoteur POMC réduirait considérablement l'expression du gène rapporteur luciférase. Enfin, il est très probable que l'effet de la délétion qui est observé par une énorme baisse de l'expression du gène rapporteur soit le reflet de l'absence de ces deux éléments et peut-être d'autres éléments régulateurs présents dans la partie distale du promoteur. Donc, pour vraiment démontrer *in vivo* la contribution de la boîte E_{neuro} à l'expression du gène de la *POMC*, il faudrait

analyser le promoteur POMC dans le contexte où la boîteE_{neuro} est rendue inactive par mutation ponctuelle.

IV.1.3 Une cascade de facteurs bHLHs corticotropiques ?

J'ai montré que la protéine NeuroD1 est absente de l'hypophyse adulte et que son expression est restreinte à une fenêtre étroite du développement allant du stade e12 à e16. Donc, si NeuroD1 est absent de l'hypophyse adulte et que celui-ci est nécessaire à l'expression de la *POMC*, comment se fait-il que la *POMC* soit exprimée dans l'hypophyse adulte ? Une hypothèse est que NeuroD1 soit exprimé à un niveau très faible, mais suffisant pour produire une activité synergique avec Pitx1. Ainsi, cette expression ne serait pas détectable par immunohistochimie avec l'anticorps anti-NeuroD1 à cause d'un manque de sensibilité. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le messenger NeuroD1 est détecté par hybridation *in situ* dans l'hypophyse adulte. Une autre façon d'expliquer cette dichotomie serait d'invoquer que une activité bHLH agissant sur la boîteE_{neuro} chez l'adulte qui est autre que NeuroD1. Ceci m'amène à postuler l'existence d'un facteur bHLH possédant une spécificité de liaison à l'ADN semblable à celle de NeuroD1. De plus, ce facteur devrait être présent dans les cellules corticotropes adultes. Dans certaines structures du système nerveux, l'expression de *NeuroD1* s'éteint au cours du développement pour être absente au stade adulte (Lee et al., 1995), comme c'est vraisemblablement le cas dans les cellules corticotropes (Poulin et al., 2000a). Dans une des structures bien étudiées du système nerveux, les ganglions trigéminaux, *NeuroD1* est remplacé au cours du développement par *NSCL1* (Ma et al., 1998b). Ainsi, peut-être que dans le cas des cellules corticotropes, NeuroD1 pourrait être remplacé au cours du développement par *NSCL1* ou par un facteur de la même famille qui aurait des propriétés de liaison à l'ADN semblable à celles de NeuroD1.

Il a été suggéré que NeuroD1 est un facteur bHLH neurogénique impliqué dans la différenciation terminale, donc exprimé relativement tardivement par rapport à d'autres membres de cette famille qui le précède dans le temps comme Neurogénine (Ma et al., 1996). Si l'ordre de la cascade de facteurs bHLHs neurogénique est respecté durant la différenciation des cellules corticotropes,

ces facteurs seraient d'excellents candidats comme facteurs bHLHs précédents NeuroD1 dans les cellules corticotropes.

IV.1.4 Facteur bHLH en amont de la cascade corticotropique

L'identification du facteur bHLH à la tête de la cascade corticotropique est très pertinente, puisqu'on pourrait obtenir un marqueur très précoce des cellules corticotropes. Ce marqueur potentiel pourrait nous aider à identifier avec précision l'origine des cellules corticotropes de l'hypophyse qui est toujours obscure. Plusieurs des facteurs bHLHs proneuraux sont des candidats qui pourraient être impliqués dans la cascade de facteurs bHLHs corticotropiques. Leurs présences pourraient expliquer le phénotype hypophysaire d'un retard corrigé de l'expression de la *POMC* lors de l'inactivation génique de *NeuroD1*. Ainsi, l'absence de NeuroD1 serait compensée par le maintien de l'expression du facteur bHLH qui le précéderait ou par l'apparition plus précoce du facteur bHLH qui devrait le suivre. Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives, mais la résultante est qu'au stade développemental e13.5 de l'hypophyse la POMC est très peu abondante comparativement aux hypophyses normales. Il est connu que *Neurogénine* amène l'activation de *NeuroD1* dans le système nerveux et dans les cellules β du pancréas (Gradwohl et al., 2000; Apelqvist et al., 1999). De plus, *Neurogénine* s'éteint suivant l'expression de *NeuroD1* (Ma et al., 1998a). Alors, il est possible que NeuroD1 permette l'activation d'un répresseur de l'expression de *Neurogénine* (Olson et al., 1998) qui lui n'apparaîtrait jamais dans les cellules corticotropes dépourvues de NeuroD1. Cet effet putatif lors de l'inactivation génique de *NeuroD1* permettrait le maintien de l'expression de *Neurogénine* dans les cellules corticotropes. Pour que le phénotype hypophysaire de la délétion génique de *NeuroD1* puisse s'expliquer par le remplacement de NeuroD1 par un facteur bHLH neurogénique du genre Neurogénine; il est préférable que ce facteur fasse partie de la cascade corticotropique et que son activité de reconnaissance de la boîte_{E_{neuro}} soit moindre que celle de NeuroD1. Parce que si l'activité de liaison pour la boîte_{E_{neuro}} de ce facteur situé en amont de la cascade corticotropique était la

même que celle de *NeuroD1*, il n'y aurait pas de phénotype hypophysaire apparent lors de l'ablation génique de *NeuroD1*. Néanmoins, il y a correction du phénotype hypophysaire plus tard durant le développement. Cette correction pourrait s'expliquer par un effet quantitatif. Il se pourrait que le facteur bHLH qui remplace *NeuroD1* dans ces conditions soit exprimé en plus forte quantité, ce qui compenserait son affinité réduite envers la boîteE_{neuro}. Ainsi, la redondance fonctionnelle partielle expliquerait le délai dans l'expression de la *POMC*.

IV.1.5 Facteur bHLH en aval de la cascade corticotropique

Il y a aussi des facteurs bHLHs neurogéniques exprimés en aval de *NeuroD1* dans le système nerveux. Il est envisageable que se soit le cas dans les cellules corticotropes puisqu'une activité bHLH semble essentielle à une forte activité transcriptionnelle du promoteur du gène de la *POMC* au stade hypophysaire adulte. Durant le développement des ganglions trigéminaux, l'expression de *NeuroD1* empêche l'expression de *NSCL1*, le dernier membre de la cascade neurogénique de cette structure neurale. De cette façon, on peut émettre l'hypothèse que le facteur bHLH complètement en aval de la cascade corticotropique apparaîtrait plus précocement puisqu'il ne serait pas réprimé lors de l'ablation génique de *NeuroD1*. Cet effet putatif pourrait aussi expliquer le phénotype du retard corrigé de l'expression de la *POMC* durant le développement. Ainsi, le facteur bHLH en aval de la cascade corticotropique qui serait présent dans l'hypophyse adulte et qui posséderait une activité transcriptionnelle très semblable à celle de *NeuroD1* remplacerait *NeuroD1* lors de l'inactivation génique de celui-ci. Les facteurs *NSCL1* et 2 n'ont pas la capacité d'activer la boîteE_{neuro} et peuvent donc être éliminés comme facteurs agissant en aval de *NeuroD1* dans l'hypophyse (résultats non-montrés). De plus, il ne faut pas exclure la possibilité que l'expression de *Neurogénine* soit maintenue lors du développement hypophysaire en même temps que l'expression du facteur bHLH en aval soit plus précoce. En accord avec l'hypothèse de facteurs bHLHs remplaçant *NeuroD1* lors de l'inactivation génique de celui-ci, il a été montré que les cellules endocrines du pancréas expriment de façon prolongée le gène *Neurogénine 3* qui est situé en amont de la cascade de

facteurs bHLHs pancréatique (Gradwohl et al., 2000). Ceci soutenant mon hypothèse d'un dérèglement du profil d'expression des gènes de la cascade corticotropique lors de l'ablation génique de *NeuroD1*.

IV.1.6 Identification de facteurs bHLHs dans l'hypophyse en développement

La conséquence de la perturbation de l'expression des facteurs bHLHs impliqués dans la cascade neurogénique lors de l'inactivation génique de *NeuroD1* pourrait être une hypophyse enrichie de facteurs bHLHs impliqués dans cette cascade corticotropique. Cette hypophyse *NeuroD1*^{-/-} devient ainsi un excellent outil pour repêcher des facteurs bHLHs qui seraient exprimés dans les cellules corticotropes de l'hypophyse. Le moment idéal pour isoler l'ARN messager de ces facteurs putatifs serait au stade e14.5 ou e15. À ce jour du développement, les autres types de cellules hypophysaires sont relativement peu nombreux, ce qui rend l'hypophyse très riche proportionnellement en cellules corticotropes. De plus, le phénotype hypophysaire à ce stade du développement est quasiment corrigé, donc le ou les gènes recherchés devraient être présents. En utilisant cette hypophyse comme source d'ARN messager, on augmente les chances de trouver un facteur bHLH restreint aux cellules corticotropes. De plus, à ce stade du développement, l'hypophyse est facile à disséquer et assez volumineuse pour produire une bonne quantité d'ARN messager.

IV.2. La voie Notch dans la différenciation des cellules corticotropes

Les facteurs bHLHs proneuraux sont contrôlés par la voie de signalisation Notch dans le système nerveux. Cette voie de signalisation est conservée chez différents organismes de la drosophile à l'humain et aussi dans différents organes, allant de l'aile de la drosophile au système nerveux murin (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Cette relation entre la cascade de facteurs bHLHs et la voie de signalisation Notch a aussi été démontrée dans le pancréas (Gradwohl et al., 2000; Apelqvist et al., 1999). Il a aussi été montré que *Notch2* est exprimé

très tôt dans l'hypophyse en développement (e10), suggérant que cette voie puisse jouer un rôle dans la différenciation des cellules de cet organe. Selon ce qui est connu de la voie Notch, celle-ci pourrait être impliquée dans la décision de l'expression du facteur bHLH en amont de la cascade. Donc, en examinant attentivement l'expression du récepteur *Notch2* à e10, au stade poche de Rathke, les quelques cellules qui seront dépourvues de ce récepteur devraient être les précurseurs des cellules corticotropes. Ces cellules devraient exprimer à la fois un ligand Notch (Delta ou Serrate) et un facteur bHLH spécifique. Par contre, même s'il a été rapporté que *Notch2* est exprimé à e10 dans la poche de Rathke (Weinmaster et al., 1991) (Weinmaster et al., 1992; Lindsell et al., 1996) (Souazé F., communication personnelle), il n'y a aucunement mention de cellules dépourvues de *Notch2*. En effet, ces cellules devraient être les cellules que l'on recherche et seraient probablement en très petit nombre, ce qui pourrait expliquer la difficulté à détecter leur présence. Donc, l'identification des précurseurs des cellules corticotropes nécessitera une analyse très minutieuse du patron d'expression des gènes *Notch* et de ces ligands potentiels au stade e10 du développement hypophysaire.

L'hypothèse qui est consécutive à l'implication de la voie Notch et de l'existence d'une cascade bHLH dans les cellules corticotropes implique que *Notch* réprime l'activité bHLH corticotropique et ainsi empêcherait l'expression de la *POMC*. J'ai commencé à tester cette hypothèse par transfection de la forme constitutivement active de *Notch1* dans les cellules AtT-20. La prédiction étant une baisse de l'activité du plasmide rapporteur contenant le promoteur complet de *POMC* et une dépendance se rapportant à la boîte E_{neuro} pour cette activité de répression. Il s'avère que cette répression est dépendante de l'activité bHLH, mais aussi reliée à la synergie puisqu'un mutant ponctuel du site de liaison *Pitx1* ne montre plus de répression (annexe II). Par ailleurs, un mutant ponctuel du site *NurRE* qui n'est pas essentiel à l'activité synergique du promoteur est toujours réprimé par la forme *Notch* constitutivement active.

Cette approche en culture cellulaire est incomplète pour confirmer ou infirmer l'implication de la voie Notch dans la différenciation des cellules

corticotropes. Le problème inhérent à ces expériences de transfection transitoire étant que les cellules sont déjà dans un état pleinement différenciées. Une façon plus appropriée de vérifier notre hypothèse est de surexprimer la forme constitutivement active de Notch sous le contrôle d'un promoteur hypophysaire comme α -GSU qui permettrait une expression très précoce (e10) et qui à ce stade du développement semble présent dans toutes les cellules. Cependant, il n'est pas impossible que l'expression amenée par ce promoteur soit absente des quelques futures cellules corticotropes puisque l' α -GSU n'est pas exprimée dans ces cellules à e12.5. Pour contourner ce problème, on pourrait utiliser le promoteur POMC qui permet une expression plus tardive, mais assurément ciblé dans les cellules corticotropes. Un promoteur qui pourrait aussi être très utile pour ce genre d'expérience en transgénèse est un promoteur POMC artificiel qui remplace la boîte E_{neuro} par la boîte E_{ubi} . Ce promoteur est très actif dans les cellules AtT-20, mais pourrait permettre une expression plus précoce en transgénèse puisqu'il dépend de l'activité bHLH ubiquitaire au lieu de l'activité NeuroD1 (Poulin et al., 2000a). Ainsi, Notch2 ou d'autres molécules pourraient être ciblées dans les cellules corticotropes de façon plus précoce. Par contre, il faudrait préalablement étudier ce promoteur en transgénèse pour déterminer son profil d'expression. Grâce à ces expériences de transgénèse et par la détermination du profil d'expression des molécules de la voie Notch, on pourrait démontrer que la voie Notch est active dans l'hypophyse, en plus des voies Fgf et BMP.

IV.3. Synergisme bHLH-Pitx

Les facteurs bHLHs myogénique ont besoin des facteurs bHLH ubiquitaires pour être actifs (Lassar et al., 1991). J'ai démontré que NeuroD1 peut former des hétérodimères actifs avec chacun des facteurs ubiquitaires connus (Poulin et al., 1997). J'ai centré mon étude sur Pan1 (E47) et démontré que contrairement à ce que j'avais imaginé, le facteur ubiquitaire Pan1 est critique pour l'interaction synergique avec Pitx1 sur le promoteur du gène

POMC. En effet, Pan1 est le facteur qui permet l'interaction entre NeuroD1 et Pitx1 en agissant comme molécule-pont entre ces facteurs à expression restreinte. Cette capacité semble conservée chez les facteurs bHLHs puisque la synergie est aussi observée avec ITF2 comme partenaire de NeuroD1. Cette interaction spécifique entre facteurs bHLH ubiquitaires et Pitxs pourrait avoir une portée plus large que la régulation de l'expression du gène de la POMC. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai utilisé un promoteur musculaire qui est transactivé par l'hétérodimère MyoD/Pan1, celui de l' α -actine squelettique. J'ai par la suite vérifié si cet hétérodimère était capable d'agir en synergie avec les membres de la famille Pitx. Les résultats obtenus montrent que Pitx1 et 3 activent le promoteur de l' α -actine squelettique et produisent une synergie en présence des facteurs bHLHs (annexe III). L'interprétation de ces résultats suggère que ce principe synergique soit conservé sur le promoteur de l' α -actine squelettique et qu'il existe peut-être d'autres cas où l'interaction bHLH-Pitx est requise pour l'expression de gènes cibles. Ainsi, il serait pertinent de vérifier la fonction de ces interactions bHLH-Pitxs dans un contexte *in vivo*. La difficulté de ce genre d'étude est double : la redondance fonctionnelle et la spécificité d'action des protéines. La redondance fonctionnelle se produit lorsqu'une fonction dépend d'un domaine protéique et que celui-ci se retrouve dans plusieurs facteurs. Dans le cas de la synergie bHLH-Pitx, il est probable que les facteurs bHLHs ubiquitaires possèdent le même domaine permettant l'interaction physique avec Pitx1. Le même raisonnement s'applique aussi avec les membres de la famille Pitx. Ainsi, on ne pourra pas apprécier toute la valeur biologique de l'interaction bHLH-Pitx si on bloque, d'une façon quelconque, l'expression d'un seul de ces facteurs. L'autre problème est celui de la spécificité. L'interaction bHLH-Pitx s'effectue par le domaine bHLH et l'homéodomaine. Ces domaines sont impliqués dans la liaison spécifique à l'ADN. Il faudra donc étudier spécifiquement l'interaction bHLH-Pitx sans perturber l'activité de liaison à l'ADN. Une façon de contrer ces difficultés serait de produire un peptide-bloqueur qui agirait spécifiquement sur l'interaction bHLH-Pitx peu importe le facteur bHLH

ubiquitaire impliqué ou le facteur Pitx. Cette étude sera très complexe, mais nous avons quelques outils en notre possession qui seront très utiles à la conception de ce peptide-bloqueur. Un de ces outils est l'essai d'interaction protéique bHLH-Pitx *in vitro*. Ainsi, après avoir dessiné des peptides-bloqueurs candidats, il serait simple de vérifier leurs efficacités à bloquer l'interaction protéique bHLH-Pitx par compétition.(Poulin et al., 2000a). Par la suite, l'activité de ces peptides-bloqueurs devra être vérifiée *in vivo*. Il sera très important que ces peptides-bloqueurs n'interfèrent pas avec les activités individuelles des facteurs bHLHs et Pitxs. De plus, ces peptides-bloqueurs devront demeurer actifs lorsqu'ils seront fusionnés à un signal de localisation nucléaire pour permettre une expression stable au noyau. La difficulté de trouver un tel peptide nécessitera l'utilisation de la mutagenèse dirigée pour identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction bHLH-Pitx. Par ailleurs, la modélisation assistée par ordinateur sera utile pour le design de ces mutants ponctuels. Il y a déjà des mutants ponctuels de l'homéodomaine de Pitx1 qui ont été produits ou qui sont en production dans notre laboratoire. Ces mutants ont été ciblés sur la base de la conservation d'acides aminés entre membres de la sous-famille Pitx, de l'exclusion des acides aminés conservés de Otx1 et de Pdx1, de leur disponibilité à la surface de l'homéodomaine, et de leur non-implication lors de la liaison de l'ADN (Poulin et al, 2000a). Les acides aminés qui répondent à ces critères ont ainsi plus de chance d'être impliqués dans l'interaction bHLH-Pitx. Enfin, ces mutants de l'homéodomaine Pitx1 pourront être analysés pour leurs capacités à lier et à activer la transcription par son site consensus, de même qu'à agir en synergie avec les facteurs bHLHs. À la lumière de ces résultats, le design de peptides-bloqueurs pourra être fait avec une plus grande acuité. Ces peptides-bloqueurs pourraient ressembler à l'interface produite soit par les bHLHs ubiquitaires ou par les facteurs Pitxs. Ainsi, par simple compétition, l'interaction bHLH-Pitx serait bloquée. La surexpression à l'aide de promoteurs qui permettraient une expression spécifique de peptides-bloqueurs par transgénèse serait très intéressante, parce que chaque système qui serait affecté impliquerait la synergie bHLH-Pitx. On pourrait s'attendre à un phénotype dans les cellules

corticotropes, et pourquoi pas dans d'autres cellules hypophysaires puisqu'on y retrouve Pitx1, Pitx2 et des facteurs bHLHs. La synergie pourrait aussi être impliquée au niveau musculaire, dans l'asymétrie gauche-droite où Pitx2 joue un rôle prépondérant et dans les neurones dopaminergiques où Pitx3 est actif. Ce genre d'expérience est évidemment à très long terme. Par contre, à plus court terme le prochain défi sera très certainement de découpler les activités biochimiques de Pan1 et Pitx1 qui sont spécifiques à leurs activités individuelles et à leurs activités synergiques. Pour y parvenir, la mutagenèse dirigée des acides aminés possiblement impliqués dans l'interaction bHLH-Pitx sera nécessaire, de même que la vérification du comportement biochimique et transcriptionnel de chacun de ces mutants.

IV.4. Conclusion

En conclusion, j'ai établi que l'existence du code combinatoire corticotropique repose en partie sur l'interaction entre facteurs bHLHs et Pitx1. Cette combinaison de facteurs contribuerait la spécificité d'expression de la POMC. J'ai aussi montré que NeuroD1 marque exclusivement les cellules corticotropes de l'hypophyse, mais dans une fenêtre de temps restreinte (e12 à e15.5). J'ai aussi démontré que l'interaction bHLH-Pitx se produit par contact direct et grâce au domaine bHLH et à l'homéodomaine. Ce qui prouve que l'homéodomaine de la sous-famille Pitx possède, en plus de sa capacité à lier l'ADN, une fonction d'interaction protéique. Des expériences de transfection suggèrent en plus que ces interactions bHLH-Pitx sont fonctionnelles sur le promoteur d'un gène spécifique aux muscles, celui de l' α -actine squelettique. La découverte de cette conservation nous a amené à évaluer un rôle potentiel de *Pitx1* lors de la myogenèse. *Pitx1* est effectivement exprimé dans une sous-population de cellules musculaires (annexe IV). Bien que mes travaux aient permis un avancement significatif, mais tout de même modeste de nos connaissances en rapport à l'expression spécifique des gènes, ils ont aussi mis à

jour beaucoup de questions. Quelle est la pertinence *in vivo* de la synergie bHLH-Pitx? Quelle est l'importance des bHLHs et conséquemment de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des cellules corticotropes ? Comment Pitx1 contrôle-t-il la transcription en interaction avec ces nombreux collaborateurs ? Ces interactions impliquent-elles des changements conformationnels ? Ainsi, même si ma contribution au problème de la spécificité transcriptionnelle est limitée, j'espère que les nombreuses questions soulevées par mes travaux seront un défi intéressant dans les années futures.

Annexe I

L'inactivation génique de NeuroD1 cause un retard dans l'expression du gène POMC

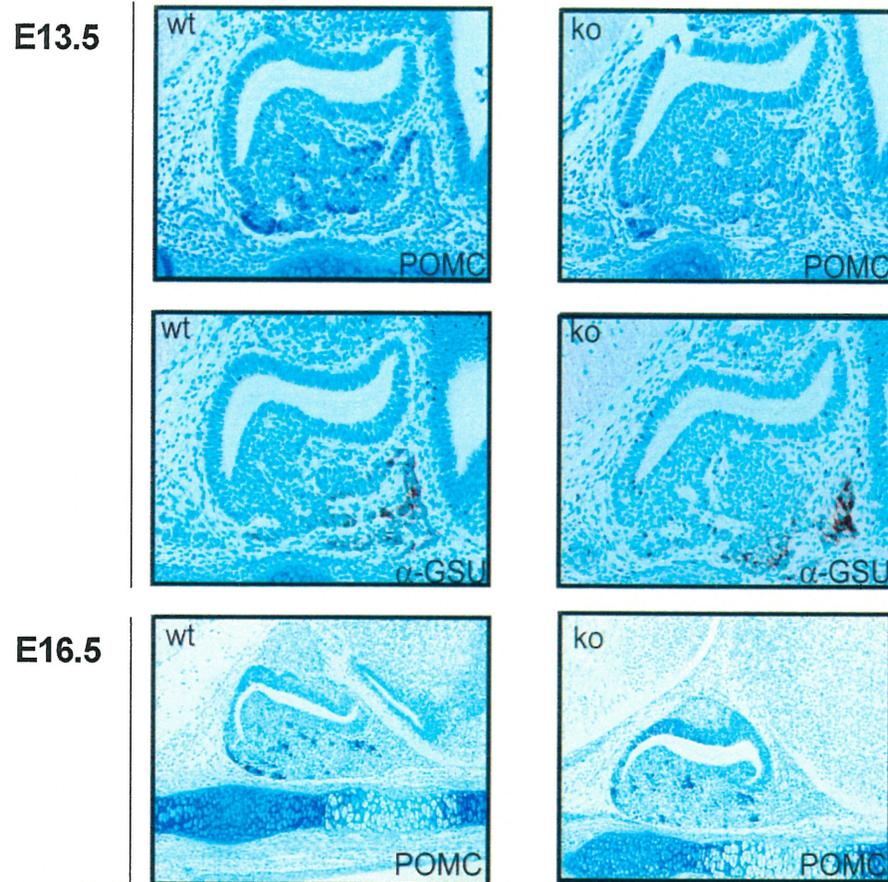


Figure annexe I. L'inactivation du gène *NeuroD1* cause un retard dans l'expression hypophysaire du gène *POMC*. Immunohistochimie contre la *POMC* ou l' α -GSU sur des hypophyses au stade e13.5 et e16.5 coupées en sagittal.

Annexe II

La forme constitutivement active de Notch réprime l'activité du promoteur du gène POMC en bloquant la synergie bHLH-Pitx

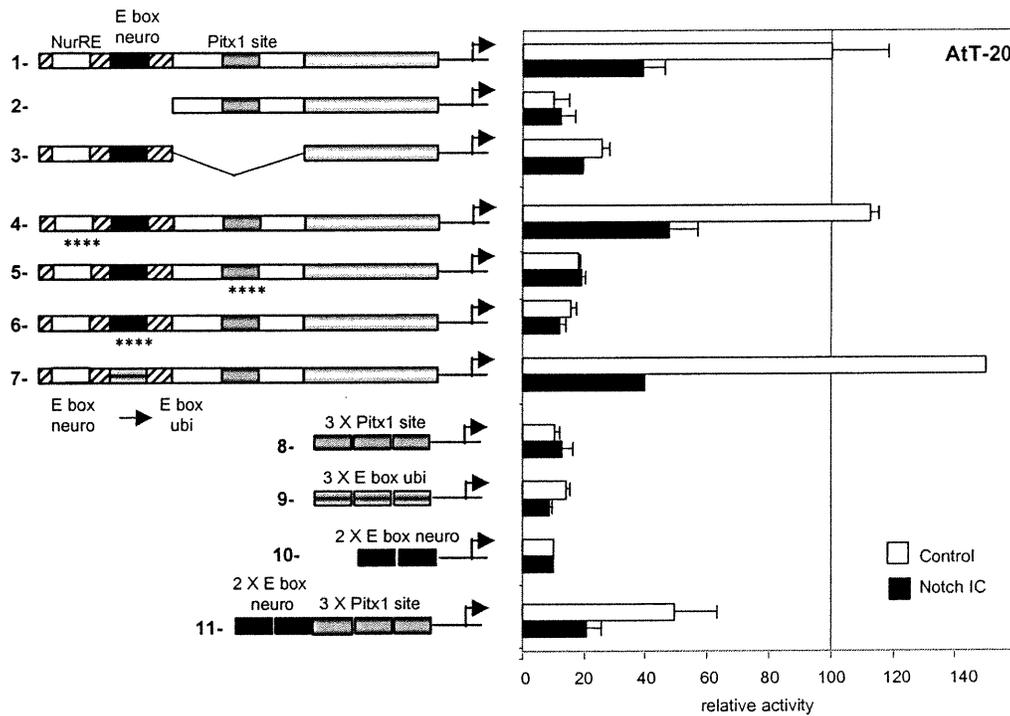


Figure annexe II. La forme constitutivement active de Notch (Notch IC) réprime l'activité du promoteur du gène POMC en bloquant la synergie bHLH-Pitx. Les cellules AtT-20 ont été transfectées avec chacune des constructions illustrées. Les mutations ponctuelles sont identifiées par **** et la flèche de la ligne 7 indique la transformation de la boîte_{neuro} en boîte_{ubi}. L'activité relative est calculée en se rapportant au promoteur complet (fait en collaboration avec Souazé F.).

Annexe III

La synergie bHLH-Pitx est aussi observée sur le promoteur du gène de l' α -actine squelettique

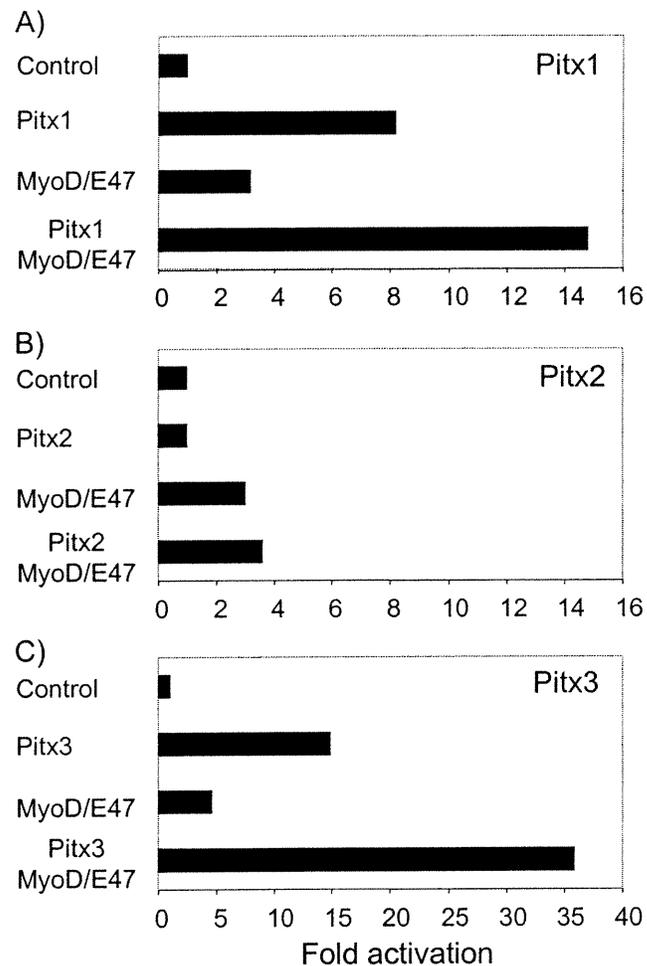


Figure annexe III. La synergie bHLH-Pitx est aussi observée sur le promoteur de l' α -actine squelettique. Des cellules Cos ont été cotransfectées avec un plasmide rapporteur luciférase contenant le promoteur de l' α -actine squelettique humaine (-2000pb à +239pb) et les plasmides effecteurs indiqués. Les résultats typiques de trois expériences différentes sont montrés. Il est à noter que Pitx2 est incapable d'activer ce promoteur: il ne peut donc pas produire d'effet synergique avec les facteurs bHLHs.

Annexe IV

Pitx1 est exprimé dans une sous-population de cellules musculaires du membre postérieur

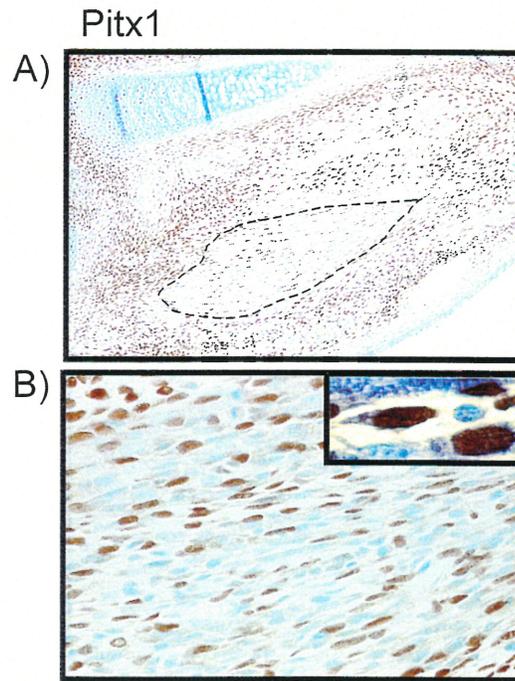


Figure annexe IV. Pitx1 est exprimé dans une sous-population de cellules musculaires du membre postérieur. A) L'expression de Pitx1 a été détectée par immunohistochimie en utilisant un anticorps contre Pitx1 sur un embryon au stade e13.5. B) Agrandissement de A et colocalisation cellulaire de l'expression de Pitx1 (noyaux bruns) avec la chaîne lourde de la myosine qui est détectée par l'anticorps monoclonal MF-20 (encadré) et révélée par l'activité phosphatase alcaline (bleue). L'encadré provient d'une coupe différente que celle montrée en A et elle consiste en un groupe musculaire du membre postérieur.

Références

Acampora,D., Mazan,S., Tuorto,F., Avantaggiato,V., Tremblay,J.J., Lazzaro,D., di Carlo,A., Mariano,A., Macchia,P.E., Corte,G., Macchia,V., Drouin,J., Brûlet,P., and Simeone,A. (1998). Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking *Otx1* reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development* 125, 1229-1239.

Alexandre,C., Jacinto,A., and Ingham,P.W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 10, 2003-2013.

Amendt,B.A., Sutherland,L.B., and Russo,A.F. (1999). Multifunctional role of the Pitx2 homeodomain protein C-terminal tail. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7001-7010.

Amendt,B.A., Sutherland,L.B., Semina,E.V., and Russo,A.F. (1998). The molecular basis of Rieger syndrome. analysis of Pitx2 homeodomain protein activities. *J. Biol. Chem.* 273, 20066-20072.

Apelqvist,A., Sommer,L., Beatus,P., Anderson,D.J., Honjo,T., Hrabe de Angelis,M., Lendahl,U., and Edlund,H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-881.

Arias,A.M., Brown,A.M., and Brennan,K. (1999). Wnt signalling: pathway or network? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 447-454.

Artavanis-Tsakonas,S., Matsuno,K., and Fortini,M.E. (1995). Notch signaling. *Science* 268, 225-232.

Artavanis-Tsakonas,S., Rand,M.D., and Lake,R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.

Avery, O.T. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcus types. *J. Exp. Med.* 79, 137-158.

Bach, I., Carriere, C., Ostendorff, H.P., Andersen, B., and Rosenfeld, M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* 11, 1370-1380.

Bach, I., Rhodes, S.J., Pearse, R.V.2., Heinzl, T., Gloss, B., Scully, K.M., Sawchenko, P.E., and Rosenfeld, M.G. (1995). P-lim, a lim homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with pit-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2720-2724.

Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M., and et al (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.

Barberis, A., Pearlberg, J., Simkovich, N., Farrell, S., Reinagel, P., Bamdad, C., Sigal, G., and Ptashne, M. (1995). Contact with a component of the polymerase ii holoenzyme suffices for gene activation. *Cell* 81, 359-68: 15.

Barnhart, K.M. and Mellon, P.L. (1994). The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol. Endocrinol.* 8, 878-885.

Bellaiche, Y. and Perrimon, N. (1997). La voie de signalisation Wingless chez la drosophile. *M S-Medecine Sciences* 13, 166-174.

Bendall, A.J., Ding, J., Hu, G., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (1999). Msx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors. *Development* 126, 4965-4976.

Benezra,R. (1994). An intermolecular disulfide bond stabilizes E2A homodimers and is required for DNA binding at physiological temperatures. *Cell* 79, 1057-1067.

Benezra,R., Davis,R.L., Lockshon,D., Turner,D.L., and Weintraub,H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59.

Berk,A.J. (1999). Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 330-335.

Boutillier,A.L., Gaiddon,C., Lorang,D., Roberts,J.L., and Loeffler,J.P. (1998). Transcriptional activation of the proopiomelanocortin gene by cyclic AMP-responsive element binding protein. *Pituitary* 1, 33-43.

Bradford,A.P., Conrad,K.E., Wasylyk,C., Wasylyk,B., and Gutierrez-Hartmann,A. (1995). Functional interaction of c-Ets-1 and GHF-1/Pit-1 mediates Ras activation of pituitary-specific gene expression: mapping of the essential c-Ets-1 domain. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2849-2857.

Braun,T., Rudnicki,M.A., Arnold,H.H., and Jaenisch,R. (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71, 369-382.

Brenner,S. (1961). RNA, ribosomes, and protein synthesis. *Sympo. Quant. Biol.* 26, 101-110.

Brenner, S. Theories of gene regulation. *Brit.med.Bull.* 21[3], 244-248. 1965.
Ref Type: Journal (Full)

Brenner, S., Jacob, F., and Meselsen, M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190, 526-581. 1961.

Ref Type: Journal (Full)

- Brohmann,H., Jagla,K., and Birchmeier,C. (2000). The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development* 127, 437-445.
- Brunk,B.P., Goldhamer,D.J., and Emerson,C.P., Jr. (1996). Regulated demethylation of the myoD distal enhancer during skeletal myogenesis. *Dev. Biol.* 177, 490-503.
- Buckingham,M. (1994). Molecular biology of muscle development. *Cell* 78, 15-21.
- Buckingham,M., Houzelstein,D., Lyons,G., Ontell,M., Ott,M.O., and Sassoon,D. (1994). Expression of muscle genes in the mouse embryo. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 46, 203-217.
- Buratowski,S. (1995). Mechanisms of gene activation. *Science* 270, 1773-1774.
- Buscher,D. and Izpisua Belmonte,J.C. (1999). Muscle development during vertebrate limb outgrowth. *Cell Tissue Res.* 296, 131-139.
- Capdevila,J. and Belmonte,J.C. (1999). Extracellular modulation of the Hedgehog, Wnt and TGF-beta signalling pathways during embryonic development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 427-433.
- Carey,M. (2000). Transcriptional regulation in eukaryotes: concepts, strategies and techniques., pp. 1-51.
- Chan,S.K., Popperl,H., Krumlauf,R., and Mann,R.S. (1996). An extradenticle-induced conformational change in a HOX protein overcomes an inhibitory function of the conserved hexapeptide motif. *EMBO J.* 15, 2476-2487.
- Chang,C.P., Shen,W.F., Rozenfeld,S., Lawrence,H.J., Largman,C., and Cleary,M.L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* 9, 663-674.

- Chatelain,A., Dupuy,J.P., and Dubois,M.P. (1979). Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH,GH, prolactin) in the fetal hypophysis of the rat: influence of the hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 196, 409-427.
- Chen,Y. and Struhl,G. (1998). In vivo evidence that Patched and Smoothened constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development* 125, 4943-4948.
- Chevallier,A., Kieny,M., and Mauger,A. (1976). [The origin of the wing musculature of birds]. [French]. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences - D: Sciences Naturelles* 282, 309-311.
- Chien,C.T., Hsiao,C.D., Jan,L.Y., and Jan,Y.N. (1996). Neuronal type information encoded in the basic-helix-loop-helix domain of proneural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13239-13244.
- Cho,M., Hughes,S.M., Karsch-Mizrachi,I., Travis,M., Leinwand,L.A., and Blau,H.M. (1994). Fast myosin heavy chains expressed in secondary mammalian muscle fibers at the time of their inception. *J. Cell Sci.* 107, 2361-2371.
- Christ,B., Jacob,H.J., and Jacob,M. (1977). Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol. (Berl)* 150, 171-186.
- Christian,J.L. (2000). BMP, Wnt and Hedgehog signals: how far can they go? *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 244-249.
- Cole,T.J., Blendy,J.A., Monaghan,A.P., Krieglstein,K., Schmid,W., Aguzzi,A., Fantuzzi,G., Hummler,E., Unsicker,K., and Schutz,G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9, 1608-1621.
- Condon,K., Silberstein,L., Blau,H.M., and Thompson,W.J. (1990). Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. *Dev. Biol.* 138, 256-274.

Couly,G.F. and Le Douarin,N.M. (1985). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev. Biol.* 110, 422-439.

Couly,G.F. and Le Douarin,N.M. (1987). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev. Biol.* 120, 198-214.

Crawford,M.J., Lanctôt,C., Tremblay,J.J., Jenkins,N., Gilbert,D., Copeland,N., Beatty,B., and Drouin,J. (1997). Human and murine *PTX1/Ptx1* gene maps to the region for Treacher Collins syndrome. *Mamm. Genome* 8, 841-845.

Crenshaw III,E.B., Kalla,K., Simmons,D.M., Swanson,L.W., and Rosenfeld,M.G. (1989). Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements. *Genes Dev.* 3, 959-972.

Crick, F. H. C. On the genetic code. *Science* 139[3554], 461-464. 1963.

Ref Type: Journal (Full)

Crick, F. H. C. The origin of the genetic code. *Journal of Molecular Biology* 38, 367-379. 1968.

Ref Type: Journal (Full)

Dahl,E., Koseki,H., and Balling,R. (1997). Pax genes and organogenesis. *Bioessays* 19, 755-765.

Dasen,J.S., O'Connell,S.M., Flynn,S.E., Treier,M., Gleiberman, AS, Szeto,D.P., Hooshmand,F., Aggarwal,A.K., and Rosenfeld,M.G. (1999). Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 97, 587-598.

Dattani, M.T., Martinez-Barbera, J.P., Thomas, P.Q., Brickman, J.M., Gupta, R., Martensson, I.L., Toresson, H., Fox, M., Wales, J.K., Hindmarsh, P.C., Krauss, S., Beddington, R.S., and Robinson, I.C. (1998). Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat. Genet.* 19, 125-133.

Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.

Dawson, S.R., Turner, D.L., Weintraub, H., and Parkhurst, S.M. (1995). Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6923-6931.

Desplan, C. (1997). Fonction des gènes Pax : synergie de liaison à l'ADN entre le domaine paried et l'homéodomaine. *M S-Medecine Sciences* 13, 147-155.

Donoghue, M.J., Morris-Valero, R., Johnson, Y.R., Merlie, J.P., and Sanes, J.R. (1992). Mammalian muscle cells bear a cell-autonomous, heritable memory of their rostrocaudal position. *Cell* 69, 67-77.

Drouin, J. (1993). Répression transcriptionnelle : glucocorticoïdes et pro-opiomélanocortine. *médecine/sciences* 9, 509-517.

Drouin, J., Lanctôt, C., and Tremblay, J.J. (1998a). La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *médecine/sciences* 14, 335-339.

Drouin, J., Maira, M.H., and Philips, A. (1998b). Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and glucocorticoid repression of POMC gene transcription. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 59-63.

Drouin,J., Sun,Y.L., Chamberland,M., Gauthier,Y., De Léan,A., Nemer,M., and Schmidt,T.J. (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* 12, 145-156.

Duboule,D. (1994). Guidebook to the homeobox genes., D.Duboule, ed. (Oxford, U.K.: Sambrook & Tooze Publication), pp. 1-284.

Duxson,M.J., Usson,Y., and Harris,A.J. (1989). The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development* 107, 743-750.

Eckner,R., Yao,T.P., Oldread,E., and Livingston,D.M. (1996). Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev.* 10, 2478-2490.

Eipper,B. and Mains,R. (1980). Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr. Rev.* 1, 1-27.

Ellenberger,T., Fass,D., Arnaud,M., and Harrison,S.C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* 8, 970-980.

Ericson,J., Norlin,S., Jessell,T.M., and Edlund,T. (1998). Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 125, 1005-1015.

Fortini,M.E. (2000). Fringe benefits to carbohydrates. *Nature* 406, 357-358.

Fortini,M.E. and Artavanis-Tsakonas,S. (1993). Notch: neurogenesis is only part of the picture. *Cell* 75, 1245-1247.

- Fredette, B.J. and Landmesser, L.T. (1991). Relationship of primary and secondary myogenesis to fiber type development in embryonic chick muscle. *Dev. Biol.* 143, 1-18.
- Gage, P.J., Roller, M.L., Saunders, T.L., Scarlett, L.M., and Camper, S.A. (1996). Anterior pituitary cells defective in the cell-autonomous factor, *df*, undergo cell lineage specification but not expansion. *Development* 122, 151-160.
- Gage, P.J., Suh, H., and Camper, S.A. (1999a). The bicoid-related *Pitx* gene family in development. *Mamm. Genome* 10, 197-200.
- Gage, P.J., Suh, H.Y., and Camper, S.A. (1999b). Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* 126, 4643-4651.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., and Wüthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.
- German, M.S., Wang, J., Chadwick, R.B., and Rutter, W.J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.* 6, 2165-2176.
- Gibson-Brown, J.J., Agulnik, S.I., Chapman, D.L., Alexiou, M., Garvey, N., Silver, L.M., and Papaioannou, V.E. (1996). Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech. Dev.* 56, 93-101.
- Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (1997). Nuclear receptor coactivators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 222-232.
- Goodman, R.H. and Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 14, 1553-1577.

Goodrich,L.V., Johnson,R.L., Milenkovic,L., McMahon,J.A., and Scott,M.P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.* 10, 301-312.

Gradwohl,G., Dierich,A., LeMeur,M., and Guillemot,F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1607-1611.

Grieshammer,U., Sassoon,D., and Rosenthal,N. (1992). A transgene target for positional regulators marks early rostrocaudal specification of myogenic lineages. *Cell* 69, 79-93.

Griffith,F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27, 113-159.

Groisman,R., Masutani,H., Leibovitch,M.P., Robin,P., Soudant,I., Trouche,D., and Harel-Bellan,A. (1996). Physical interaction between the mitogen-responsive serum response factor and myogenic basic-helix-loop-helix proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 5258-5264.

Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C. G., Riseborough, R. W., and Watson, J. D. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labeling of *E. coli*. *Nature* 190, 581-585. 1961.

Ref Type: Journal (Full)

Gross,M.K., Moran-Rivard,L., Velasquez,T., Nakatsu,M.N., Jagla,K., and Goulding,M. (2000). Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development* 127, 413-424.

Grossman,A. (1995). Corticotropin-releasing hormone : basic physiology and clinical applications. In *Endocrinology*, L.J.Degroot, M.Besser, M.Burger, J.L.Jameson, D.L.Loriaux, J.C.Marshall, W.D.Odell, J.T.Jr.Potts, and A.H.Rubenstein, eds. (New York: W.B. Saunders Company), pp. 341-367.

- Guarente,L. (1995). Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 20, 517-521.
- Guillemot,F., Caspary,T., Tilghman,S.M., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins, NA, Anderson,D.J., Joyner,A.L., Rossant,J., and Nagy,A. (1995). Genomic imprinting of *Mash2*, a mouse gene required for trophoblast development. *Nat. Genet.* 9, 235-242.
- Guillemot,F., Lo,L.C., Johnson,J.E., Auerbach,A., Anderson,D.J., and Joyner,A.L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.
- Gumbiner,B. and Kelly,R.B. (1982). Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells. *Cell* 28, 51-59.
- Hammerschmidt,M., Brook,A., and McMahon,A.P. (1997). The world according to hedgehog. *Trends Genet.* 13, 14-21.
- Hampsey,M. and Reinberg,D. (1999). RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 132-139.
- Hanes,S.D. and Brent,R. (1989). DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *Cell* 57, 1275-1283.
- Harris,A.J., Duxson,M.J., Fitzsimons,R.B., and Rieger,F. (1989). Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles. *Development* 107, 771-784.
- Harvey,R.P. (1998). Links in the left/right axial pathway. *Cell* 94, 273-276.
- Hassan,B.A. and Bellen,H.J. (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev.* 14, 1852-1865.

Hasty,P., Bradley,A., Hsi Morris,J., Edmondson,D.G., Venuti,J.M., Olson,E.N., and Klein,W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501-506.

Heitzler,P. and Simpson,P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-1092.

Henthorn,P., McCarrick-Walmsley,R., and Kadesch,T. (1990). Sequence of the cDNA encoding ITF-1, a positive-acting transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 18, 677.

Hermesz,E., Mackem,S., and Mahon,K.A. (1996). Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 122, 41-52.

Hobert,O. and Westphal,H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* 16, 75-83.

Horvath,E. and Kovacs,K. (1994). Morphology of adenohypophysial cells and pituitary adenomas. In *The pituitary gland*, H.Imura, ed. (New York: Raven Press, Ltd.), pp. 29-37.

Hsu,H.L., Wadman,I., and Baer,R. (1994). Formation of in vivo complexes between the TAL1 and E2A polypeptides of leukemic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3181-3185.

Hu,J.-S., Olson,E.N., and Kingston,R.E. (1992). HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1031-1042.

Ikeda,Y., Lala,D.S., Luo,X., Kim,E., Moisan,M.P., and Parker,K.L. (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* 7, 852-860.

Ingraham,H.A., Chen,R., Mangalam,H.J., Elsholtz,H.P., Flynn,S.E., Lin,C.R., Simmons,D.M., Swanson,L., and Rosenfeld,M.G. (1988). A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55, 519-529.

Ingraham,H.A., Lala,D.S., Ikeda,Y., Luo,X., Shen,W.H., Nachtigal,M.W., Abbud,R., Nilson,J.H., and Parker,K.L. (1994). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* 8, 2302-2312.

Jacob, F. and Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3, 318-356. 1961.

Ref Type: Journal (Full)

Jacobson,E.M., Li,P., Leon-del-Rio,A., Rosenfeld,M.G., and Aggarwal,A.K. (1997). Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes Dev.* 11, 198-212.

Jacobson,L. and Drouin,J. (1994). Regulation of proopiomelanocortin gene transcription. In *The pituitary gland*, H.Imura, ed. (New York: Raven Press, Ltd.), pp. 117-138.

Japon,M.A., Rubinstein,M., and Low,M.J. (1994). In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1117-1125.

Jarman,A.P., Sun,Y., Jan,L.Y., and Jan,Y.N. (1995). Role of the proneural gene, *atonal*, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* 121, 2019-2030.

Johnson,D.E. and Williams,L.T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60, 1-41.

- Johnson, J.D., Zhang, W., Rudnick, A., Rutter, W.J., and German, M.S. (1997). Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3488-3496.
- Johnson, J.E., Birren, S.J., Saito, T., and Anderson, D.J. (1992b). DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3596-3600.
- Johnson, J.E., Zimmerman, K., Saito, T., and Anderson, D.J. (1992a). Induction and repression of mammalian achaete-scute homologue (MASH) gene expression during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Development* 114, 75-87.
- Jun, S. and Desplan, C. (1996). Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122, 2639-2650.
- Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Asakura, A., Tapscott, S.J., and Rudnicki, M.A. (1997). MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development* 124, 4729-4738.
- Kageyama, R. and Nakanishi, S. (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 659-665.
- Kageyama, R., Sasai, Y., Akazawa, C., Ishibashi, M., Takebayashi, K., Shimizu, C., Tomita, K., and Nakanishi, S. (1995). Regulation of mammalian neural development by helix-loop-helix transcription factors. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9, 177-188.
- Kapiloff, M.S., Farkash, Y., Wegner, M., and Rosenfeld, M.G. (1991). Variable effects of phosphorylation of Pit-1 dictated by the DNA response elements. *Science* 253, 786-789.

- Kardon,G. (1998). Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 125, 4019-4032.
- Karlstrom,R.O., Talbot,W.S., and Schier,A.F. (1999). Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target gli2 affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev.* 13, 388-393.
- Kawakami,K., Sato,S., Ozaki,H., and Ikeda,K. (2000). Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* 22, 616-626.
- Kawamura,K. and Kikuyama,S. (1992). Evidence that hypophysis and hypothalamus constitute a single entity from the primary stage of histogenesis. *Development* 115, 1-9.
- Kawamura,K. and Kikuyama,S. (1998). Morphogenesis of the hypothalamus and hypophysis: their association, dissociation and reassociation before and after "Rathke". *Arch. Histol. Cytol.* 61, 189-198.
- Kikuyama,S., Inaco,H., Jenks,B.G., and Kawamura,K. (1993). Development of the ectopically transplanted primordium of epithelial hypophysis (anterior neural ridge) in *Bufo japonicus* embryos. *J. Exp. Zool.* 266 , 216-220.
- Kioussi,C., Carriere,C., and Rosenfeld,M.G. (1999a). A model for the development of the hypothalamic-pituitary axis: transcribing the hypophysis. *Mech. Dev.* 81, 23-35.
- Kioussi,C., O'Connell,S., St Onge,L., Treier,M., Gleiberman,A.S., Gruss,P., and Rosenfeld,M.G. (1999b). Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14378-14382.
- Kissinger,C.R., Liu,B.S., Martin-Blanco,E., Kornberg,T.B., and Pabo,C.O. (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 A resolution:

a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63, 579-590.

Klint,P. and Claesson-Welsh,L. (1999). Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front. Biosci.* 4, D165-D177.

Kondoh,H., Uchikawa,M., Yoda,H., Takeda,H., Furutani,S., M, and Karlstrom,R.O. (2000). Zebrafish mutations in Gli-mediated hedgehog signaling lead to lens transdifferentiation from the adenohypophysis anlage. *Mech. Dev.* 96, 165-174.

Lala,D.S., Rice,D.A., and Parker,K.L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol. Endocrinol.* 6, 1249-1258.

Lamolet,B., Pulichino,A.M., Lamonerie,T., Gauthier,Y., Brue,T., Enjalbert,A., and Drouin,J. (2001). A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell In press.*

Lamonerie,T., Tremblay,J.J., Lanctôt,C., Therrien,M., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1996). PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* 10, 1284-1295.

Lanctôt,C., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1999b). Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 140, 1416-1422.

Lanctôt,C., Lamolet,B., and Drouin,J. (1997). The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124, 2807-2817.

Lanctôt,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L., and Drouin,J. (1999a). Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* 126, 1805-1810.

Lassar,A.B., Davis,R.L., Wright,W.E., Kadesch,T., Murre,C., Voronova,A., Baltimore,D., and Weintraub,H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315.

Lassar,A.B., Paterson,B.M., and Weintraub,H. (1986). Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* 47, 649-656.

Lebel, M., Gauthier, Y., Moreau, A., and Drouin, J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high affinity binding site. *Journal of Neurochemistry* in press. 2001.

Ref Type: Journal (Full)

Lee,J.E., Hollenberg,S.M., Snider,L., Turner,D.L., Lipnick,N., and Weintraub,H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.

Lee,S.L., Sadovsky,Y., Swirnof,A.H., Polish,J.A., Goda,P., Gavrulina,G., and Milbrandt,J. (1996). Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273, 1219-1221.

Lemon,B. and Tjian,R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14, 2551-2569.

Li,S., Crenshaw,E.B.I., Rawson,E.J., Simmons,D.M., Swanson,L.W., and Rosenfeld,M.G. (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347, 528-533.

Lin,C.R., Kloussi,C., O'Connell,S., Briata,P., Szeto,D., Liu,R., Izpisua-Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401, 279-282.

- Lin, Y.-S., Carey, M., Ptashne, M., and Green, M.R. (1990). How different eukaryotic transcriptional activators can cooperate promiscuously. *Nature* 345, 359-361.
- Lindsell, C.E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A., and Weinmaster, G. (1996). Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 14-27.
- Lipkin, S.M., Näär, A.M., Kalla, K.A., Sack, R.A., and Rosenfeld, M.G. (1993). Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *Genes Dev.* 7, 1674-1687.
- Liu, M., Pleasure, S.J., Collins, A.E., Noebels, J.L., Naya, F.J., Tsai, M.J., and Lowenstein, D.H. (2000). Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 9;97(10):5679]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 865-870.
- Lo, L.C., Johnson, J.E., Wuenschell, C.W., Saito, T., and Anderson, D.J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev.* 5, 1524-1537.
- Logan, M., Pagán-Westphal, S.M., Smith, D.M., Paganessi, L., and Tabin, C.J. (1998). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94, 307-317.
- Logan, M. and Tabin, C.J. (1999). Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* 283, 1736-1739.
- Lugo, D.I. and Pintar, J.E. (1996b). Ontogeny of basal and regulated proopiomelanocortin-derived peptide secretion from fetal and neonatal pituitary intermediate lobe cells: melanotrophs exhibit transient glucocorticoid responses during development. *Dev. Biol.* 173, 110-118.

- Lugo,D.I. and Pintar,J.E. (1996a). Ontogeny of basal and regulated secretion from POMC cells of the developing anterior lobe of the rat pituitary gland. *Dev. Biol.* 173, 95-109.
- Lugo,D.I., Roberts,J.L., and Pintar,J.E. (1989). Analysis of pro-opiomelanocortin gene expression during prenatal development of the rat pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* 3, 1313-1324.
- Luo,X., Ikeda,Y., and Parker,K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-490.
- Ma,J. and Ptashne,M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55, 443-446.
- Ma,Q., Chen,Z., del,B.B., I, de la Pompa,J.L., and Anderson,D.J. (1998b). neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-482.
- Ma,Q., Chen,Z., del,B.B., I, de la Pompa,J.L., and Anderson,D.J. (1998a). Neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-482.
- Ma,Q., Fode,C., Guillemot,F., and Anderson,D. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev.* 13, 1717-1728.
- Ma,Q., Sommer,L., Cserjesi,P., and Anderson,D.J. (1997). Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J. Neurosci.* 17, 3644-3652.
- Ma,Q.F., Kintner,C., and Anderson,D.J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.

Mangalam,H.J., Albert,V.R., Ingraham,H.A., Kapiloff,M., Willson,L., Nelson,C., Elsholtz,H., and Rosenfeld,M.G. (1989). A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev.* 3, 946-958.

Mankoo,B.S., Collins,N.S., Ashby,P., Grigorieva,E., Pevny,L.H., Candia,A., Wright,C.V., Rigby,P.W., and Pachnis,V. (1999). Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. *Nature* 400, 69-73.

Marcinkiewicz,M., Day,R., Seidah,N.G., and Chretien,M. (1993). Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4922-4926.

Maroto,M., Reshef,R., Munsterberg,A.E., Koester,S., Goulding,M., and Lassar,A.B. (1997). Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* 89, 139-148.

Martens, C., Maira, M. H., Philips, A., Gauthier, Y., and Drouin, J. Transcriptional antagonism between the Nur77/NGFI-B orphan subfamily and glucocorticoid receptor is due to direct protein:protein interactions. Submitted . 9-1-2000.
Ref Type: Journal (Full)

Martin,P. (1990). Tissue patterning in the developing mouse limb. *Int. J. Dev. Biol.* 34, 323-336.

Massague,J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.

Massague,J. and Wotton,D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19, 1745-1754.

- Miyata,T., Maeda,T., and Lee,J.E. (1999). NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.* *13*, 1647-1652.
- Mutoh,H., Fung,B.P., Naya,F.J., Tsai,M.J., Nishitani,J., and Leiter,A.B. (1997). The basic helix-loop-helix transcription factor beta2/neurod is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 3560-3564.
- Mutoh,H., Naya,F.J., Tsai,M.J., and Leiter,A.B. (1998). The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev.* *12*, 820-830.
- Nabeshima,Y., Hanaoka,K., Hayasaka,M., Esumi,E., Li,S., and Nonaka,I. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* *364*, 532-535.
- Nagulapalli,S. and Atchison,M.L. (1998). Transcription factor Pip can enhance DNA binding by E47, leading to transcriptional synergy involving multiple protein domains. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 4639-4650.
- Naya,F.J., Huang,H.P., Qiu,Y., Mutoh,H., DeMayo,F.J., Leiter,A.B., and Tsai,M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* *11*, 2323-2334.
- Naya,F.J., Stellrecht,C.M.M., and Tsai,M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* *9*, 1009-1019.
- Nelsen,B., Tian,G., Erman,B., Gregoire,J., Maki,R., Graves,B., and Sen,R. (1993). Regulation of lymphoid-specific immunoglobulin mu heavy chain gene enhancer by ETS-domain proteins. *Science* *261*, 82-86.

- Nelson,C., Shen,L.P., Meister,A., Fodor,E., and Rutter,W.J. (1990). Pan: a transcriptional regulator that binds chymotrypsin, insulin, and AP-4 enhancer motifs. *Genes Dev.* 4, 1035-1043.
- Neuman,T., Keen,A., Zuber,M.X., Kristjansson,G.I., Gruss,P., and Nornes,H.O. (1993). Neuronal expression of regulatory helix-loop-helix factor Id2 gene in mouse. *Dev. Biol.* 160, 186-195.
- Norlin,S., Nordstrom,U., and Edlund,T. (2000). Fibroblast growth factor signaling is required for the proliferation and patterning of progenitor cells in the developing anterior pituitary. *Mech. Dev.* 96, 175-182.
- Ohneda,K., Mirmira,R.G., Wang,J.H., Johnson,J.D., and German,M.S. (2000). The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol. Cell. Biol.* 20, 900-911.
- Okimura,Y., Howard,P.W., and Maurer,R.A. (1994). Pit-1 binding sites mediate transcriptional responses to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate through a mechanism that does not require inducible phosphorylation of Pit-1 [see comments]. *Mol. Endocrinol.* 8, 1559-1565.
- Oliver,G., Loosli,F., Koster,R., Wittbrodt,J., and Gruss,P. (1996). Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech. Dev.* 60, 233-239.
- Oliver,G., Mailhos,A., Wehr,R., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Gruss,P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121, 4045-4055.
- Olson,E.C., Schinder,A.F., Dantzker,J.L., Marcus,E.A., Spitzer,N.C., and Harris,W.A. (1998). Properties of ectopic neurons induced by Xenopus neurogenin1 misexpression. *Mol. Cell. Neurosci.* 12, 281-299.

Olson,E.N. (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* 4, 1454-1461.

Olson,E.N. and Klein,W.H. (1994). bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* 8, 1-8.

Ontell,M., Ontell,M.P., Sopper,M.M., Mallonga,R., Lyons,G., and Buckingham,M. (1993). Contractile protein gene expression in primary myotubes of embryonic mouse hindlimb muscles. *Development* 117, 1435-1444.

Ordahl,C.P. and Le Douarin,N.M. (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 114, 339-353.

Pabo,C.O. and Nekludova,L. (2000). Geometric analysis and comparison of protein-DNA interfaces: why is there no simple code for recognition? *J. Mol. Biol.* 301, 597-624.

Pabo,C.O. and Sauer,R.T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 1053-1095.

Pardee, A. B., Jacob, F., and Monod, J. The genetic control and cytoplasmic expression of inducibility in the synthesis of β -galactosidase by *E. coli*. *Journal of Molecular Biology* 1, 165-178. 1959.

Ref Type: Journal (Full)

Park,H.L., Bai,C., Platt,K.A., Matisse,M.P., Beeghly,A., Hui,C.C., Nakashima,M., and Joyner,A.L. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 127, 1593-1605.

Parker,K.L. and Schimmer,B.P. (1997). Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* 18, 361-377.

Paroush,Z., Finley,R.L., Jr., Kidd,T., Wainwright,S.M., Ingham,P.W., Brent,R., and Ish-Horowicz,D. (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79, 805-815.

Peterson,C.L. and Workman,J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 187-192.

Philips,A., Maira,M.H., Mullick,A., Chamberland,M., Lesage,S., Hugo,P., and Drouin,J. (1997). Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5952-5959.

Piedra,M.E., Icardo,J.M., Albajar,M., Rodriguez-Rey,J.C., and Ros,M.A. (1998). Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 94, 319-324.

Piper,D.E., Batchelor,A.H., Chang,C.P., Cleary,M.L., and Wolberger,C. (1999). Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* 96, 587-597.

Poulin,G., Lebel,M., Chamberland,M., Paradis,F.W., and Drouin,J. (2000a). Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4826-4837.

Poulin,G., Marcil,A., Lebel,M., Moreau,A., Camilot,M., and Drouin,J. (2000c). Impaired secondary myogenesis in Pitx1-null embryos. Submitted.

Poulin,G., Sweeney,F., Marcil,A., Camilot,M., and Drouin,J. (2000b). Transcriptional properties of the Pitx homeodomain sub-family on the skeletal α -actin promoter. Submitted.

Poulin,G., Turgeon,B., and Drouin,J. (1997). NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6673-6682.

Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335, 683-689.

Ptashne, M. and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386, 569-77: 2.

Qiu, Y., Sharma, A., and Stein, R. (1998). p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2957-2964.

Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., and Schutz, G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531-541.

Rivera, R.R., Stuver, M.H., Steenbergen, R., and Murre, C. (1993). Ets proteins: new factors that regulate immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7163-7169.

Robey, E. (1997). Notch in vertebrates. *Curr. Neurol.* 7, 551-557.

Rosen, G.D., Sanes, J.R., LaChance, R., Cunningham, J.M., Roman, J., and Dean, D.C. (1992). Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* 69, 1107-1119.

Rudnicki, M.A., Braun, T., Hinuma, S., and Jaenisch, R. (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71, 383-390.

Rudnicki, M.A., Schlegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.

Ruiz-Gomez,M. and Ghysen,A. (1993). The expression and role of a proneural gene, *achaete*, in the development of the larval nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* 12, 1121-1130.

Ryan,A.K., Blumberg,B., Rodriguez-Esteban,C., Yonei-Tamura,S., Tamura,I., Tsukui,T., de la Peña,J., Sabbagh,W., Greenwald,J., Choe,S., Norris,D.P., Robertson,E.J., Evans,R.M., Rosenfeld,M.G., and Izpisúa Belmonte,J.C. (1998). *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394, 545-551.

Sabourin,L.A., Girgis-Gabardo,A., Seale,P., Asakura,A., and Rudnicki,M.A. (1999). Reduced differentiation potential of primary *MyoD*^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 144, 631-643.

Saisanit,S. and Sun,X.H. (1997). Regulation of the pro-B-cell-specific enhancer of the *Id1* gene involves the C/EBP family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17, 844-850.

Sasai,Y. and De Robertis,E.M. (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev. Biol.* 182, 5-20.

Sasai,Y., Kageyama,R., Tagawa,Y., Shigemoto,R., and Nakanishi,S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* 6, 2620-2634.

Sassoon,D., Lyons,G.E., Wright,W.E., Lin,V., Lassar,A., Weintraub,H., and Buckingham,M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and *MyoD1* during mouse embryogenesis. *Nature* 341, 303-307.

Saucedo-Cardenas,O., Quintana-Hau,J.D., Le,W.D., Smidt,M.P., Cox,J.J., DeMayo,F., Burbach,J.P.H., and Conneely,O.M. (1998). *Nurr1* is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4013-4018.

Sauer,F., Hansen,S.K., and Tjian,R. (1995b). DNA template and activator-coactivator requirements for transcriptional synergism by *Drosophila bicoid* [see comments]. *Science* 270, 1825-1828.

Sauer,F., Hansen,S.K., and Tjian,R. (1995a). Multiple TAFIIs directing synergistic activation of transcription. *Science* 270, 1783-1788.

Schafer,K. and Braun,T. (1999). Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene *Lbx1h*. *Nat. Genet.* 23, 213-216.

Schweickert,A., Campione M, Steinbeisser,H., and Blum,M. (2000). *Pitx2* isoforms: involvement of *Pitx2c* but not *Pitx2a* or *Pitx2b* in vertebrate left-right asymmetry. *Mech. Dev.* 90, 41-51.

Schwind,J. (1928). The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am. J. Anat.* 41, 295-319.

Scully,K.M., Gleiberman,A.S., Lindzey,J., Lubahn,D.B., Korach,K.S., and Rosenfeld,M.G. (1997). Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* 11, 674-681.

Seidah,N.G., Marcinkiewicz,M., Benjannet,S., Gaspar,L., Beaubien,G., Mattei,M.G., Lazure,C., Mbikay,M., and Chrétien,M. (1991). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol. Endocrinol.* 5, 111-122.

Semina,E.V., Ferrell,R.E., Mintz-Hittner,H.A., Bitoun,P., Alward,W.L.M., Reiter,R.S., Funkhauser,C., Daack-Hirsch,S., and Murray,J.C. (1998). A novel homeobox gene *PITX3* is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat. Genet.* 19, 167-170.

Semina,E.V., Murray,J.C., Reiter,R., and Hrstka,R.F.G.J. (2000). Deletion in the promoter region and altered expression of pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1575-1585.

Semina,E.V., Reiter,R., Leysens,N.J., Alward,W.L., Small,K.W., Datson,N.A., Siegel-Bartelt,J., Bierke-Nelson,D., Bitoun,P., Zabel,B.U., Carey,J.C., and Murray,J.C. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat. Genet.* 14, 392-399.

Semina,E.V., Reiter,R.S., and Murray,J. (1997). Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2109-2116.

Seo,H.C., Curtiss,J., Mlodzik,M., and Fjose,A. (1999). Six class homeobox genes in drosophila belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech. Dev.* 83, 127-139.

Seydoux,G. and Greenwald,I. (1989). Cell autonomy of lin-12 function in a cell fate decision in *C. elegans*. *Cell* 57, 1237-1245.

Sharma,A., Moore,M., Marcora,E., Lee,J.E., Qiu,Y., Samaras,S., and Stein,R. (1999). The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. *Mol. Cell. Biol.* 19, 704-713.

Sharma,K., Sheng,H.Z., Lettieri,K., Li,H., Karavanov,A., Potter,S., Westphal,H., and Pfaff,S.L. (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* 95, 817-828.

Shen,W.H., Moore,C.C., Ikeda,Y., Parker,K.L., and Ingraham,H.A. (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77, 651-661.

Sheng,H.Z., Zhadanov,A.B., Mosinger,B., Fujii,T., Bertuzzi,S., Grinberg,A., Lee,E.J., Huang,S.P., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* 272, 1004-1007.

Simmons,D.M., Voss,J.W., Ingraham,H.A., Holloway,J.M., Broide,R.S., Rosenfeld,M.G., and Swanson,L.W. (1990). Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* 4, 695-711.

Sloan,S.R., Shen,C.P., McCarrick-Walmsley,R., and Kadesch,T. (1996). Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6900-6908.

Smidt,M., van Schaick,H.S.A., Lanctôt,C., Tremblay,J.J., Cox,J.J., van der Kleij,A.A.M., Wolterink,G., Drouin,J., and Burbach,P.H. (1997). A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13305-13310.

Sommer,L., Ma,Q., and Anderson,D.J. (1996). neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 221-241.

Sornson,M.W., Wu,W., Dasen,J.S., Flynn,S.E., Norman,D.J., O'Connell,S.M., Gukovsky,I., Carriere,C., Ryan,A.K., Miller,A.P., Zuo,L., Gleiberman,A.S., Andersen,B., Beamer,W.G., and Rosenfeld,M.G. (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384, 327-333.

Stockdale,F.E. and Miller,J.B. (1987). The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles. [Review] [108 refs]. *Dev. Biol.* 123, 1-9.

- Sudarsanam,P. and Winston,F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet.* 16, 345-351.
- Sun,X.-H. and Baltimore,D. (1991). An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64, 459-470.
- Sutton,W.S. (1903). The chromosome in heredity. *Dial Bull* 4, 231-251.
- Suzuki,M. (1994). A framework for the DNA-protein recognition code of the probe helix in transcription factors: the chemical and stereochemical rules. *Structure* 2, 317-326.
- Szeto,D.P., Rodriguez-Esteban,C., Ryan,A.K., O'Connell,S., Liu,R., Kioussi,C., Gleiberman,A.S., Izpisua-Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). Role of the bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* 13, 484-494.
- Szeto,D.P., Ryan,A.K., O'Connell,S.M., and Rosenfeld,M.G. (1996). P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7706-7710.
- Taylor,S.M., and Jones, P.A. (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*,17, 771-779.
- Therrien,M. and Drouin,J. (1991). Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3492-3503.
- Therrien,M. and Drouin,J. (1993). Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2342-2353.

- Topilko,P., Schneider-Maunoury,S., Levi,G., Trembleau,A., Gourdji,D., Driancourt,M.A., Rao,C.V., and Charnay,P. (1998). Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr- 1)-targeted mice. *Mol. Endocrinol.* 12, 107-122.
- Treier,M., Gleiberman,A.S., O'Connell,S.M., Szeto,D.P., McMahan,J.A., McMahan,A.P., and Rosenfeld,M.G. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* 12, 1691-1704.
- Treier,M., O'Connell,S., Gleiberman,A., Price,J., Szeto,D.P., Burgess,R., Chuang,P.T., McMahan,A.P., and Rosenfeld,M.G. (2001). Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 128 , 377-386.
- Treisman,J., Harris,E., and Desplan,C. (1991). The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev.* 5, 594-604.
- Tremblay,J.J. and Drouin,J. (1999). Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2567-2576.
- Tremblay,J.J., Goodyer,C.G., and Drouin,J. (2000). Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinol.* 71, 277-286.
- Tremblay,J.J., Lanctôt,C., and Drouin,J. (1998a). The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol. Endocrinol.* 12, 428-441.
- Tremblay,J.J., Marcil,A., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1999). Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J.* 18, 3431-3441.

- Tremblay,P., Dietrich,S., Mericskay,M., Schubert,F.R., Li,Z., and Paulin,D. (1998b). A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors. *Dev. Biol.* 203, 49-61.
- Tucker-Kellogg,L., Rould,M.A., Chambers,K.A., Ades,S.E., Sauer,R.T., and Pabo,C.O. (1997). Engrailed (Gln50-->Lys) homeodomain-DNA complex at 1.9 Å resolution: structural basis for enhanced affinity and altered specificity. *Structure* 5, 1047-1054.
- Tullius,T. (1995). Homeodomains: together again for the first time. *Structure* 3, 1143-1145.
- Turner,D.L. and Weintraub,H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev.* 8, 1434-1447.
- Um,S., Harbers,M., Benecke,A., Pierrat,B., Losson,R., and Chambon,P. (1998). Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 273, 20728-20736.
- Ura,K., Kurumizaka,H., Dimitrov,S., Almouzni,G., and Wolffe,A.P. (1997). Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J.* 16, 2096-2107.
- Voronova,A.F. and Lee,F. (1994). The E2A and tal-1 helix-loop-helix proteins associate in vivo and are modulated by Id proteins during interleukin 6-induced myeloid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5952-5956.
- Wade,P.A. and Wolffe,A.P. (1997). Histone acetyltransferases in control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, R82-4: 2.
- Walsh,K. and Perlman,H. (1997). Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 597-602.

Watanabe, Y.G. and Daikoku, S. (1979). An immunohistochemical study on the cytodifferentiation of adenohypophysial cells in fetal rats. *Dev. Biol.* 68, 557-567.

Watson, J. D. Involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science* 140[3562], 17-26. 1963.

Ref Type: Journal (Full)

Watson, J. D. and Crick, F. H. C. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 964-967. 1953.

Ref Type: Journal (Full)

Watson, J. D. and Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171[4356], 737-738. 1953.

Ref Type: Journal (Full)

Watson, J.D., Hopkins, N.M., Roberts, J.W., Steitz, J.A., and Weiner, A.M. (1989b). *Biologie moléculaire du gène*. In *Biologie moléculaire du gène*, (Paris: Interédition), pp. 68-99.

Watson, J.D., Hopkins, N.M., Roberts, J.W., Steitz, J.A., and Weiner, A.M. (1989a). *Biologie moléculaire du gène*. In *Biologie moléculaire du gène*, Interédition, ed. (Paris: pp. 3-25.

Weinmaster, G., Roberts, V.J., and Lemke, G. (1991). A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199-205.

Weinmaster, G., Roberts, V.J., and Lemke, G. (1992). Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116, 931-941.

Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.

Wigmore, P.M. and Dunlison, G.F. (1998). The generation of fiber diversity during myogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 117-125.

Williams,B.A. and Ordahl,C.P. (2000). Fate restriction in limb muscle precursor cells precedes high-level expression of MyoD family member genes. *Development* 127, 2523-2536.

Wilson,C.J., Chao,D.M., Imbalzano,A.N., Schnitzler,G.R., Kingston,R.E., and Young,R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.

Wilson,D., Sheng,G., Lecuit,T., Dostatni,N., and Desplan,C. (1993). Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev.* 7, 2120-2134.

Wilson,D.S., Guenther,B., Desplan,C., and Kuriyan,J. (1995). High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA. *Cell* 82, 709-719.

Wolberger,C., Vershon,A.K., Liu,B., Johnson,A.D., and Pabo,C.O. (1991). Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* 67, 517-528.

Wolffe,A.P. (1994). Transcription: in tune with the histones. *Cell* 77, 13-6: 21.

Wright,W.E., Sassoon,D.A., and Lin,V.K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607-617.

Wu,W., Cogan,J.D., Pfaffle,R.W., Dasen,J.S., Frisch,H., O'Connell,S.M., Flynn,S.E., Brown,M.R., Mullis,P.E., Parks,J.S., Phillips,J.A., III, and Rosenfeld,M.G. (1998). Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* 18, 147-149.

Xu,L., Lavinsky,R.M., Dasen,J.S., Flynn,S.E., McInerney,E.M., Mullen,T.M., Heinzl, T, Szeto,D., Korzus,E., Kurokawa,R., Aggarwal,A.K., Rose,D.W., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1998). Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* 395, 301-306.

Yoshioka,H., Meno,C., Koshiba,K., Sugihara,M., Itoh,H., Ishimaru,Y., Inoue,T., Ohuchi,H., Semina,E.V., Murray,J.C., Hamada,H., and Noji,S. (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94, 299-305.

Zetterstrom,R.H., Solomin,L., Jansson,L., Hoffer,B.J., Olson,L., and Perlmann,T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276, 248-250.

Zhao,L., Bakke,M., Krimkevich,Y., Cushman,L.J., Parlow,A.F., Camper,S.A., and Parker,K.L. (2001). Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* 128, 147-154.

Zhuang,Y., Soriano,P., and Weintraub,H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-884.